

# **Einfluss von Flotillinen auf die Expression von desmosomalen Adhäsionsproteinen in Keratinozyten**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Ali, Jawahir  
aus Jamame (Somalia)

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Biochemisches Institut

1. Gutachterin: Prof. Dr. Tikkanen
2. Gutachter: Prof. Dr. Jung

Tag der Disputation:  
30.11.2021

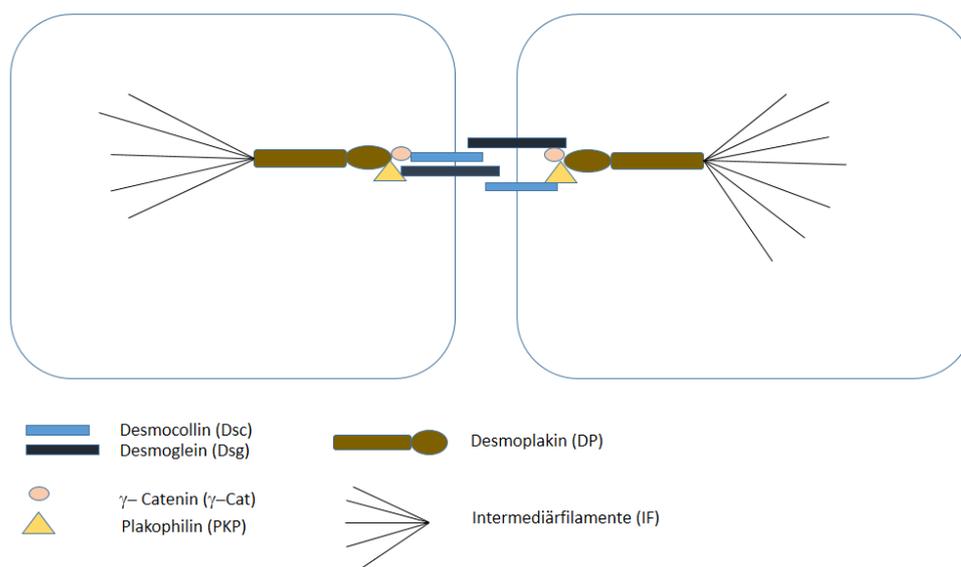
I	Einleitung .....	3
I.1	Desmosomen.....	3
I.1.1	Desmosomale Cadherine .....	4
I.1.2	Armadillo Proteinfamilie .....	11
I.1.3	Plakin Proteinfamilie .....	15
I.1.4	Assemblierung und Desassemblierung .....	17
I.2	Flotilline .....	18
I.2.1	Vorkommen und Struktur .....	18
I.2.2	Funktion .....	20
I.2.3	Interaktion mit Zellkontakten .....	21
I.3	Ziele dieser Arbeit .....	22
II	Material und Methoden.....	24
II.1	Material.....	24
II.1.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	24
II.1.2	Chemikalien und Puffer.....	25
II.1.3	Antibiotika.....	27
II.1.4	Antikörper .....	27
II.1.5	Humane Zelllinie .....	28
II.1.6	Programme für statistische Analyse, Bild- und Textbearbeitung.....	29
II.2	Methoden .....	29
II.2.1	Zellbiologische Standardmethoden .....	29
II.2.2	Proteinbiochemische Methoden .....	31
II.2.3	Immunfluoreszenzfärbungen .....	34
II.2.4	Statistische Auswertung und Bearbeitung .....	35
III	Ergebnisse .....	36
III.1	Einfluss von Flot-1- und Flot-2-Knockdown auf die Expression von Desmoglein-2 in HaCaT-Keratinozyten.....	36

III.2	Einfluss von Flot-1- und Flot-2-Knockdown auf die Lokalisation und Morphologie des Dsg2-Proteins in HaCaT-Keratinocyten.....	38
III.3	Auswirkung von Flot-1- und Flot-2-Knockdown auf den Desmoplakin Expressionslevel in HaCaT Keratinocyten.....	39
III.4	Inhibierung des lysosomalen Abbaus führt zu Akkumulation von Dsg3 und Dsg2 in HaCaT-Keratinocyten.....	41
III.5	Nach Inhibierung des lysosomalen Abbaus in HaCaT-Keratinocyten akkumuliert Dsg3 in Lysosomen.....	44
III.6	Immunfluoreszenz Doppelfärbung von Dsg-2 und Lamp1 nach Bafilomycin A Behandlung in HaCaT-Keratinocyten.....	53
III.7	Expressionslevel von desmosomalen Zelladhäsionsproteinen nach Behandlung mit Cycloheximid in HaCaT-Keratinocyten.....	57
III.8	Expressionslevel von Zelladhäsionsproteinen nach doppelter Behandlung mit Cycloheximid und Bafilomycin A in HaCaT-Keratinocyten.....	58
IV	Diskussion.....	60
V	Ausblick.....	69
I.	Zusammenfassung .....	70
II.	Summary .....	72
III.	Abkürzungsverzeichnis .....	74
IV.	Abbildungsverzeichnis .....	75
V.	Tabellenverzeichnis .....	77
VI.	Literaturverzeichnis .....	78
VII.	Publikationen.....	103
VIII.	Ehrenwörtliche Erklärung .....	104
IX.	Danksagung.....	105
X.	Tabellarischer Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

# I Einleitung

## I.1 Desmosomen

Desmosomen gehören neben Adhärenzverbindungen, Tight Junctions und Gap Junctions zu den zellverbindenden Strukturen. Der Zellkontakt über Desmosomen stabilisiert das Gewebe und schützt es vor mechanischen Scherkräften. Desmosomen kommen beispielsweise im Epithelgewebe (Epidermis), Muskelgewebe (Kardiomyozyten) und Nervengewebe (meningeale Zellen) (Al-Jassar et al. 2013) und damit in vielen Organen (z.B. Milchdrüse, Trachea, Darm, Harnblase) vor. Besonders zahlreich sind sie in Organen und Geweben mit mechanischer Belastung (z. B. Haut, Herz) (Al-Amoudi et al. 2011; Amagai und Stanley 2012). Die in den Desmosomen enthaltenen Proteine gehören zu den drei Proteinfamilien desmosomale Cadherine, Armadillo-Proteine und Plakin-Proteine (Abbildung 1) (Huber 2003).



**Abbildung 1: Aufbau eines Desmosoms zwischen benachbarten Zellen**

Desmosomale Adhäsion zwischen zwei benachbarten Zellen werden im Interzellularraum durch desmosomale Cadherine, Transmembranproteine, vermittelt (Dsc, Dsg). Intrazellulär werden diese durch Proteine der Armadillo-Proteinfamilie (PKP und  $\gamma$ -Catenin) an Desmoplakin verknüpft. Letztendlich stellt Desmoplakin die Verbindung zum Zytoskelett (IF) der Zelle her.

### I.1.1 Desmosomale Cadherine

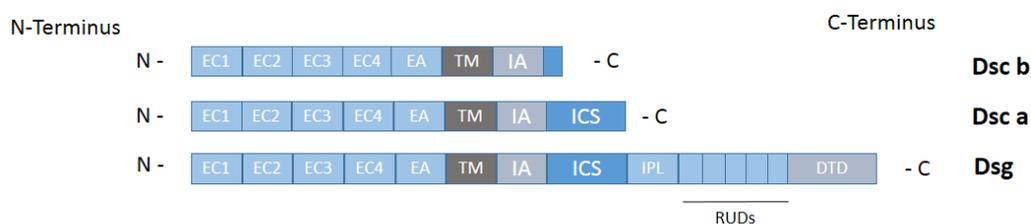
Die desmosomalen Cadherine sind Teil der Cadherin-Superfamilie (Angst et al. 2001), die durch mehrere extrazelluläre Cadherin-(EC)-Domäne charakterisiert ist. Die Cadherin-Superfamilie umfasst sechs Subgruppen (desmosomale Cadherine, klassische Cadherine, Protocadherine, Cadherine der FAT-Familie, T-Cadherine, Sieben-Pass-Transmembran-Cadherine), die sich anhand der Anzahl (2-34) der EC-Domänen sowie der Vielfältigkeit ihrer zytoplasmatischen Domäne, die es ermöglicht je nach Subgruppe spezifische Wechselwirkungen mit zytoplasmatischen Komponenten einzugehen, unterscheiden (Angst et al. 2001). Die desmosomalen Cadherine ähneln den klassischen Cadherinen. Beide besitzen vier EC und eine EA Domäne, aber unterschiedliche intrazelluläre Domänen. Die EC-Domänen können homo- oder heterophile Bindungen mit benachbarten Zellen eingehen (Syed et al. 2002; Chitaev und Troyanovsky 1997; Nollet et al. 2000).

#### I.1.1.1 Vorkommen und Struktur

Desmosomale Cadherine sind unerlässlich für die desmosomale Zelladhäsion und kommen in allen Desmosomen vor (Waschke 2008). Insgesamt existieren vier *Desmoglein-* (*Dsg*)- und drei *Desmocollin-* (*Dsc*)-Gene, die auf Chromosom 18 codiert werden (Nollet et al. 2000; Whittock und Bower 2003; Garrod und Chidgey 2008; Hunt et al. 1999). Von den *Dsc*-Isoformen gibt es aufgrund eines alternativen Splice-Vorgangs eine a und b Variante (Parker et al. 1991; Mechanic et al. 1991; Collins et al. 1991). Die *Dsg*- und *Dsc*-Isoformen haben ein gewebespezifisches Expressionsmuster. Während *Dsg2* und *Dsc2* in nahezu allen Desmosomen-tragenden Geweben und vermehrt in Herzmuskelzellen vorkommen, werden *Dsg1*, 3 und 4 sowie *Dsc 1* und 3 in mehrschichtigen Epithelgeweben exprimiert (Waschke 2008; Bazzi und Christiano 2007). Dabei befinden sich *Dsg1*, *Dsc1* und *Dsg4* hauptsächlich in den oberen Epidermisschichten, wohingegen *Dsg2* und 3 sowie *Dsc2* und 3 primär in den basalen, unteren Epidermisschichten zu finden sind (Thomason et al. 2010; Saito et al. 2012; North et al. 1996).

In Desmosomen bilden desmosomale Cadherine eine Brücke zwischen dem extrazellulären und dem intrazellulären Raum. Mithilfe von Kryoelektronen-Tomographie und Immun-Elektronenmikroskopie können die Strukturen der Desmosomen und deren Interaktion dargestellt werden (Al-Amoudi et al. 2011). Die desmosomalen Cadherine sind in der Plasmamembran verankert und bestehen aus einem transmembranären, einem intrazellulären Carboxyl-terminalen und einem extrazellulären Amino-(N)-terminalen Anteil

(Abbildung 2). Dsg und Dsc unterscheiden sich vor allem in ihrem intrazellulären Anteil. Bei beiden desmosomalen Cadherinen schließt sich nach der transmembranären Domäne eine intrazelluläre-Anchor-(IA)-Domäne, gefolgt von einer intrazellulären Cadherin-ähnlichen Sequenz (ICS) an. Eine Ausnahme bilden die Dsc-Varianten b, die keine ICS-Domänen besitzen (Trojanovsky et al. 1994). Die Dsc-Varianten a enden intrazellulär mit der ICS-Domäne. Bei den vier Dsg-Isoformen schließen sich an die ICS-Domäne die intrazelluläre Proline-reiche-(IPL)-Domäne, die Repeat-Unit-Domäne (RUD) und die Dsg-Terminal-Domäne (DTD) an (Garrod und Chidgey 2008). Der intrazelluläre Anteil stellt mithilfe weiterer desmosomaler Komponenten (z.B. Plakoglobin (PG), Desmoplakin (DP)) die Verbindung zum Zytoskelett der Zelle her (Kowalczyk et al. 1994). Der extrazelluläre Anteil besteht aus vier EC-Domänen gefolgt von einem extrazellulären Anchor (EA). Im interzellulären Raum verbinden sich die EC-Domänen benachbarter Zellen (Takeichi 1990).



**Abbildung 2: Struktureller Aufbau der desmosomalen Cadherine**

Von oben nach unten sind Desmocollin (Dsc) b und a sowie Desmoglein (Dsg), mit jeweils vier extrazellulären Cadherin (EC) und einem extrazellulären Anchor (EA) zu sehen. Diese befinden sich im extrazellulären Raum. Im Intramembranösen Raum findet man die Transmembran (TM) Domäne gefolgt vom intrazellulären Anchor und der intrazellulären Cadherin Sequenz (ICS), die sich im intrazellulären Raum befinden. Dsc b besitzt keine ICS. Dsc a endet mit der ICS. An der ICS vom Dsg sind weitere Domänen angeknüpft wie die intrazelluläre Proline-rich-Linker (IPL), eine variable Anzahl an Repeat-Unit-Domain (RUD), und Desmoglein-Terminal-Domain (DTD).

### I.1.1.2 Funktion

Neben ihrer Funktion im Rahmen der Zelladhäsion spielen desmosomale Cadherine auch bei der Entwicklung und Differenzierung von Zellen eine Rolle und beeinflussen somit die Embryo- und Morphogenese (Angst et al. 2001). Weiterhin belegen Studien, dass desmosomale Cadherine auch an der Tumorgenese und Wundheilung beteiligt sind (Thomason et al. 2010).

Bei der Verbindung benachbarter Zellen hat die EC1-Domäne eine wichtige Aufgabe. Sie besitzt eine Adhäsionserkennungsstelle, die aus einem Tripeptidmotiv besteht (Tselepis et al. 1998). In klassischen Cadherinen enthält das Motiv die Aminosäuren Histidin/Alanin/Valin; in Dsg und Dsc je nach Isoform Tyrosin/Alanin/Threonin, Arginin/Alanin/Leucin oder Phenylalanin/Alanin/Threonin (Blaschuk et al. 1990). Zudem befindet sich in der EC1-Domäne ein konserviertes Tryptophan, das mit der Adhäsionserkennungsstelle der EC1-Domäne eines benachbarten Cadherins interagiert (Al-Amoudi et al. 2007; He et al. 2003; Pertz et al. 1999).

Für eine Adhäsion benachbarter Zellen sind mindestens zwei desmosomale Cadherine auf jeder Zelle erforderlich (Marcozzi et al. 1998; Kowalczyk et al. 1996). Die kleinste Einheit eines Desmosoms, die eine Adhäsion ermöglicht, besteht aus den Proteinen Dsc, Dsg, PG und DP. PG verlinkt die desmosomalen Cadherine mit DP, das wiederum für die Verbindung des Proteinkomplexes mit den Intermediärfilamenten (IF) verantwortlich ist (Garrod et al. 2002a). Ein Charakteristikum der Desmosomen / desmosomaler Cadherine, das sie von Adhärenzverbindung/ klassischen Cadherinen unterscheidet, ist ein sogenannter hyperadhäsiver Zustand. Am Anfang der Embryo- und Morphogenese gehen Desmosomen calciumabhängige lockere Bindungen ein, die leicht durch Calciumreduktion (z.B. Chelatbildner) gelöst werden können. Dieser Zustand ist zu diesem Zeitpunkt wichtig für die Zellplastizität (Thomason et al. 2012; Garrod et al. 2005; Kimura et al. 2007). Nach dem Durchlaufen eines Reifungsprozesses, erreichen Desmosomen einen hyperadhäsiven Zustand. Die nun calciumunabhängige Bindung stärkt die Gewebeintegrität und die Adhäsion der Zellen, so dass sie mechanischen Scherkräften standhalten können (Kowalczyk und Green 2013). Dieser calciumunabhängige Zustand kann in Wunden wieder in einen calciumabhängigen Zustand übergehen (Kowalczyk und Green 2013). Dieser Prozess scheint durch die Proteinkinase C (PKC) reguliert zu werden (Thomason et al. 2010; Kowalczyk und Green 2013). Die PKC bindet an alle Dsg-Isoformen in der RUD-Domäne (Garrod et al. 2005; Kimura et al. 2007) und führt durch Phosphorylierung zu Konformationsänderungen, die den hyperadhäsiven Zustand beenden (Kimura et al. 2007; Garrod et al. 2005). Die desmosomale Adhäsion wird von PKC, die Threonine und Serine phosphoryliert, und durch weitere Tyrosin-Phosphorylierungen reguliert (Garrod et al. 2002b). Eine weitere Regulationsmöglichkeit ist die intrazelluläre Calciumkonzentration, die bei der Darier-Krankheit gestört ist. Krankheitsauslöser sind Mutationen in den *ATP2A2*- und *ATP2C1*-Genen, die für intrazelluläre Calciumpumpen kodieren (Sakuntabhai et al. 1999). Die unterschiedliche Adhäsionsfähigkeit desmosomaler Cadherine

(Hartlieb et al. 2013; Kowalczyk et al. 1994) und ihr spezifisches Expressionsmuster in der mehrschichtigen Epidermis sorgen in den unteren proliferativen Epidermisschichten für eine ausreichende Zellplastizität und in den oberen Schichten für eine erhöhte Haftfestigkeit, die für die Barrierefunktion erforderlich ist (Johnson et al. 2014).

Das spezifische Expressionsmuster der desmosomalen Cadherine in der Epidermis deutet auf eine Rolle bei der Differenzierung und Morphogenese hin (Saito et al. 2012; Thomason et al. 2010). Zur Evaluation dieser Hypothese wurden Mäuse genetisch so verändert (Simpson et al. 2011), dass sie *Dsg3* und *Dsc3*, die normalerweise in den unteren Schichten der Epidermis gebildet werden, auch in den höheren suprabasalen Schichten exprimierten. Diese veränderte Expression führte zu einer erhöhten Zellproliferation und veränderten Differenzierung der Zellen in den suprabasalen Schichten. Die Veränderungen hingen von dem gewählten Promotor für das *Dsg3*-Gen ab. Bei einem Keratin-1-Promotor kam es neben der Hyperproliferation zu epidermalen Veränderungen, Hautablagerungen, Akanthose, Hypergranulose, Pustelbildung sowie zu einer abnormalen Verteilung verschiedener Keratine (Merritt et al. 2002). Bei einer Expression von *Dsg3* unter dem Involucrin-Promotor wandelte sich dagegen der Phänotyp des Epithels von einem kutanen Typ zu einem Schleimhauttyp um. Die daraus folgende Barriere- und Funktionsstörung führte zu einem transepidermalen Flüssigkeitsverlust und zum Tod durch Austrocknung nach der Geburt (Elias et al. 2001; Merritt et al. 2002). Ein *Dsg3*-knockdown in Mäusen hat eine verminderte Zellproliferation zur Folge (Mannan et al. 2011). *Dsg3* reguliert auch die Proliferation von Keratinozyten, indem es mit PG interagiert. Störungen der *Dsg3*/PG-Interaktion führen zu einer erhöhten Expression von c-Myc (Müller et al. 2008; Williamson et al. 2006). Bei der Fehlexpression von *Dsc3* wurde neben einer veränderten Differenzierung, einer Hyperproliferation und abnormer Keratinisierung, eine erhöhte  $\beta$ -Catenin-Stabilität und Signalaktivität beobachtet (Hardman et al. 2005). Darüber hinaus führt eine *Dsg2*-Fehlexpression in suprabasalen Schichten zu Papillombildung und Hyperproliferation, indem Signalkaskaden, die für das Wachstum, die Proliferation und das Überleben notwendig sind, aktiviert werden (Brennan et al. 2007; Brennan und Mahoney 2014). *Dsg2* ist essentiell für die embryonale Stammzellproliferation (Eshkind et al. 2002). Im Gegensatz zu *Dsg2* fördert das in suprabasalen Schichten der Epidermis exprimierte *Dsg1* die Differenzierung, indem es im Komplex mit Erbin die Signaltransduktion epidermaler Wachstumsfaktoren unterdrückt (Getsios et al. 2009; Samuelov et al. 2013). Desmosomale Cadherine sind auch an der Haarfollikel-Reifung beteiligt. Eine Fehlexpression von *Dsg3* in suprabasalen Schichten führt zu einer gestörten

Haarfollikel-Bildung und eine Dsg4-Mutation zu einer Hypotrichose bei Menschen und Mäusen (Kljuic et al. 2003). Eine Dsc1-Deletion hat eine epidermale Hyperproliferation mit einer gesteigerten K6/16-Expression, eine Haarfollikel-Degeneration und somit eine Alopezie zur Folge (Chidgey et al. 2001).

Darüber hinaus sind desmosomale Cadherine für die embryonale Entwicklung unverzichtbar. Obwohl sich reife Desmosomen erst in einem späteren Stadium der Embryogenese (Trophoektoderm Tag 3,5) entwickeln (Fleming et al. 1991), treten einzelne Komponenten (z. B. desmosomale Cadherine, PG, DP) bereits in früheren Stadien auf (Fleming et al. 2000; Jackson et al. 1980). Mäuse ohne Dsg2 bzw. Dsc3 sterben in einem frühen embryonalen Stadium (Den et al. 2006; Eshkind et al. 2002). Da Dsg2 zu diesem Zeitpunkt in den embryonalen Stammzellen außerhalb von Desmosomen vorliegt, beruht dieser Effekt nicht auf einer Störung der Adhäsivität. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Letalität beim Fehlen von Dsg2 zum Zeitpunkt der Implantation (Tag 4,5 der embryonalen Entwicklung) auf einer Störung der Stammzellproliferation zurückzuführen ist (Eshkind et al. 2002). Mäuse ohne Dsc3 sterben am Tag 2,5 der embryonalen Entwicklung. Auch hier handelt es sich daher nicht um eine Störung der Adhäsivität (Den et al. 2006). Auch PG und DPL werden in frühen Stadien der embryonalen Entwicklung gebildet. Das Fehlen dieser Proteine führt in Maus-Modellen zum embryonalen Tod, wobei man hier von einer Störung der adhäsiven Funktion ausgeht (Fleming et al. 1994).

Die verschiedenen Funktionen desmosomaler Cadherine im Rahmen der Embryo- und Morphogenese sowie der Differenzierung legen die Vermutung nahe, dass sie auch bei der Tumorgenese von Bedeutung sind (Kowalczyk und Green 2013). Die Expression von Dsg2 in den oberen Epithelschichten genetisch veränderter Mäuse fördert die Bildung präkanzeröser Papillome und die Anfälligkeit gegenüber chemischen Karzinogenen (Brennan et al. 2007; Brennan und Mahoney 2014). Verschiedene Studien belegen eine Überexpression desmosomaler Proteine bei Krebserkrankungen der Haut, der Prostata und der Lunge. Die Überexpression desmosomaler Komponenten (z.B. Dsg2, Dsg3, Plakophilin-3 (PKP3)) korreliert mit einer erhöhten Tumorprogression (Brennan und Mahoney 2014; Chen et al. 2007; Furukawa et al. 2005), möglicherweise über proliferationsfördernde und anti-apoptische Effekte. Auf der anderen Seite wird eine verminderte Expression von desmosomalen Proteinen bei verschiedenen epithelialen Tumorformen wie Magen-, Darm-, Blasen-, Gebärmutterhals- und Endometrium-Karzinomen beobachtet (Dusek und Attardi 2011). Bei Melanomen, Plattenepithel- und Magen-Karzinomen wurde sowohl eine erhöhte als auch eine verminderte Expression von Dsg2 gefunden

(Yashiro et al. 2006; Khan et al. 2006). Teilweise scheinen desmosomale Komponenten eine tumorsuppressive Wirkung zu haben (Dusek und Attardi 2011). In einer Studie wurden differenzierte Keratinozyten aus Dsg1-knockdown-Mäusen und Kontrollmäusen einer UV-Strahlung ausgesetzt. In den Zellen aus den Dsg1-knockdown-Mäusen kam es zu einer Abnahme der Apoptose. Dieser Befund spricht für eine Tumorsuppressor-Funktion von Dsg1, der den UV-induzierten-Zelltod bei Keratinozyten reguliert (Dusek et al. 2006).

#### I.1.1.3 Dysregulation & Störungen

Neben Krebserkrankungen können Dysregulationen desmosomaler Cadherine durch Autoantikörper, bakterielle Toxine oder Mutationen schwerwiegende und zum Teil letale Folgen für den Organismus haben. Störungen der desmosomalen Funktion durch Autoantikörper führen zur Akantholyse und somit zu den Autoimmunerkrankungen Pemphigus vulgaris und foliaceus. Beim Pemphigus vulgaris unterscheidet man einen mukosalen von einem mukokutanen Phänotyp. Beim mukosalen Phänotyp richten sich die Autoantikörper gegen das in den basalen Schichten der Epidermis und in der Mundschleimhaut vorkommende Dsg3. Beim mukokutanen Phänotyp richten sich die Autoantikörper zusätzlich gegen das sich in suprabasalen Schichten der Epidermis befindliche Dsg1, wodurch sowohl die Haut- als auch die Mundschleimhaut betroffen sind (Stanley und Amagai 2006b; Amagai 1999). Beim Pemphigus foliaceus richten sich die gebildeten Autoantikörper hauptsächlich gegen Dsg1, somit wird die Blasenbildung hier in der suprabasalen Epidermis beobachtet (Walter et al. 2017; Anhalt und Diaz 2001; Stanley und Amagai 2006a; Amagai 1999; Walter et al. 2019).

Aktuell werden zwei Mechanismen der Blasenbildung diskutiert. Einerseits legen Befunde nahe, dass die Autoantikörper durch die Bindung an die EC1-Domäne von Dsg1 oder Dsg3 ein räumliches Hindernis für die Adhäsion an benachbarte Zellen darstellen (Heupel et al. 2008; Payne et al. 2005). Auf der anderen Seite wird durch die Bindung des Autoantikörpers an desmosomale Cadherine eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, die zu deren Abbau und in Folge zur Störung der Zelladhäsion und zur Blasenbildung führt (Amagai 1999; Calkins et al. 2006; Sharma et al. 2007; Delva et al. 2008; Walter et al. 2017; Walter et al. 2019). Eine weitere Dermatose mit epidermaler Blasenbildung ist das Staphylococcal-scalded-skin-Syndrom. Auslöser sind bakterielle Toxine, die zu den Serinproteasen gehören (Exfoliatin A und B) und die über die Spaltung der extrazellulären Domäne von Dsg1 die epidermale Barriere stören (Amagai et al. 2000;

Amagai et al. 2002). Eine weitere Erkrankung, bei der Serinproteasen und die Störung der Epidermis eine Rolle spielen, ist das Netherton-Syndrom. Die autosomal-rezessive Erkrankung wird durch Mutationen des Serinprotease-Inhibitors LEKT1 (lymphoepithelialer Kazal-Typ-abhängiger Inhibitor) verursacht. Dadurch kommt es zu einer gesteigerten tryptischen und chymotryptischen Enzymaktivität und somit zum vermehrten Abbau von Dsg1 und ganzer Desmosomen. Diese Vorgänge manifestieren sich bei den Patienten in einer gestörten Hautbarriere (Chavanas et al. 2000; Descargues et al. 2005). Darüber hinaus fungiert Dsg2 als Rezeptor für eine Subklasse von Adenoviren, die Infektionen des Respirationstraktes und der Harnwege verursachen (Wang et al. 2011). Zudem verursachen Mutationen in Genen desmosomaler Cadherine Haut-, Haar- und Herzerkrankungen (Garrod et al. 2002b). Die Striate palmoplantare Keratodermie (SPPK), die sich als fokale oder diffuse hyperkeratotische Plaques an Fingern, Handflächen und Fußsohlen manifestiert, ist mit einer autosomal dominanten Mutation im *Dsg1*-Gen assoziiert (Rickman et al. 1999; Hunt et al. 2001; Harmon et al. 2013). Auch Mutationen im *Dsc2*- und *DP*-Gen wurden mit der Erkrankung in Verbindung gebracht (Rickman et al. 1999). Da Dsg2 und Dsc2 die vorherrschenden desmosomalen Cadherine in Kardiomyozyten sind, kommt es bei Mutationen in den entsprechenden Genen zu einer arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC) (Pilichou et al. 2006) mit rechtsventrikulärer Hypertrophie und Dysfunktion, Herzrhythmusstörungen und plötzlichem Herztod. Eine histopathologische Besonderheit der ARVC ist die Umwandlung von Muskelzellen zu Fettzellen. Auch Mutationen in den Genen der Armadillo- und Plakin-Proteinfamilie können eine ARVC verursachen (Gerull et al. 2004; McKoy et al. 2000; Rampazzo et al. 2002). Bislang ist beim Menschen jedoch keine *Dsg3*-Mutation bekannt, und *Dsg3*-Knockdown-Mäuse zeigten verminderte PG-Niveaus und eine Akantholyse (Thomason et al. 2010). Bei *Dsc3*-Knockdown-Mäusen kommt es zu epidermalen Blasenbildung, wohingegen beim kompletten Fehlen von *Dsc3* es zu einer frühen embryonalen Letalität kommt (Chen et al. 2008). *Dsg4*-Genmutationen äußern sich in einer gestörten Haarfollikelreifung und Hypotrichose (Kljuic et al. 2003).

## I.1.2 Armadillo Proteinfamilie

Zur Armadillo-Proteinfamilie gehören u.a.  $\beta$ -Catenin, PG, p120catenin,  $\delta$ -Catenin, p0071 und Plakophilin 1-3 (PKP). PG und PKP 1–3 sind essentielle Komponenten von Desmosomen (Hatzfeld 2007). Armadillo-Proteine besitzen einen einheitlichen Aufbau aus zentralen Arm-Wiederholungsmotiven (Garrod und Chidgey 2008).

### I.1.2.1 Vorkommen und Struktur

PG (auch  $\gamma$ -Catenin genannt) ist ein wesentlicher Bestandteil von Desmosomen und daher in allen Desmosomen-tragenden Geweben zu finden. Darüber hinaus kommt PG auch in Adhärenzverbindungen vor, wo es mit dem verwandten  $\beta$ -Catenin um Bindungsstellen konkurriert (Cowin et al. 1986; Franke et al. 1989). Aufgrund der hohen Affinität zu Desmosomen ist PG dort aber weitaus häufiger anzutreffen (Chitaev et al. 1996). Das *PG*-Gen liegt auf Chromosom 17. Das Protein besteht aus zwölf zentralen Armadillo-Domänen mit jeweils 42 variablen Aminosäuren und aus einer C- und N-terminalen Domäne (Abbildung 3) (Garrod und Chidgey 2008).



### Abbildung 3: Struktureller Aufbau von Plakoglobin (PG)

PG besteht aus einem zentralen Bereich aus zwölf Arm-Wiederholungsdomänen sowie einem N-terminalen Kopfteil und einem C-terminalen Schwanzteil. Es hat eine hohe Affinität zu Desmosomen, kommt aber auch in Adhärenzverbindungen vor. Es stellt neben PKP und DP die Verknüpfung zwischen desmosomalen Caderinen und dem Zytoskelett dar.

Die drei humanen *PKP*-Gene liegen auf den Chromosomen 1, 11 und 12 (Bonné et al. 1998). Von PKP1 und PKP2 existiert jeweils eine kürzere (a) und eine längere (b) Spleiß-Variante (Mertens et al. 1996; Schmidt et al. 1997). PKP1 befindet sich hauptsächlich in komplexen und geschichteten Epithelgeweben (Heid et al. 1994; Schmidt et al. 1997), PKP2 dagegen in einfachen Epithelgeweben, in basalen Schichten von mehrschichtigem Epithelgewebe und in Herzmuskelgewebe (Mertens et al. 1996; Franke et al. 2006). PKP3 kommt in allen Desmosomen-tragenden Geweben vor, mit Ausnahme von Herzmuskelzellen (Bonné et al. 1999; Schmidt et al. 1999). In mehrschichtigem Epithelgewebe, wie

die Epidermis, zeigen die PKPs ein bestimmtes Expressionsmuster. PKP1 und PKP2 findet man auch im Zellkern, PKP1b sogar ausschließlich dort (Waschke 2008). Darüber hinaus kommen PKPs auch in nicht Desmosomen-tragenden Geweben (z.B. Fibroblasten, Lymphozyten) vor (Mertens et al. 1996; Schmidt et al. 1999; Bonn  et al. 1999). PKPs bestehen aus neun zentralen Armadillo-Domänen sowie einer Amino- und Carboxyldom ne (Abbildung 4). Aufgrund einer flexiblen Insertion zwischen den Arm-Wiederholungen 5 und 6 ist die Gesamtstruktur gekrümmt (Choi und Weis 2005; Hatzfeld 2007).



**Abbildung 4: Struktureller Aufbau von Plakophilin (PKP)**

Es gibt drei Plakophilin Isoformen, PKP 1-3. Sie bestehen alle aus neun zentralen Arm-Wiederholungen. An dem Kopfteil befindet sich eine Aminodom ne und an dem Schwanzteil eine Carboxyldom ne. In der Gesamtstruktur ist eine Krümmung zwischen den Arm-Wiederholungsmotiven 5 und 6 zu beobachten, die aufgrund einer flexiblen Insertion entstanden ist.

PG und PKP bilden an der intrazellulären Seite der Plasmamembran zusammen mit dem C-terminalen Ende der desmosomalen Cadherine und dem N-terminalen Ende des DPL einen Proteinkomplex, der sich in der Elektronenmikroskopie als dunkle Verdichtung ( uere Plaque-Verdichtung; Outer-Dense-Plaque, ODP) darstellt (Delva et al. 2009). Die innere, hellere Plaque-Verdichtung (Inner-Dense-Plaque, IDP) im Abstand von 30–50 nm von der Plasmamembran besteht aus dem C-terminalen Ende eines DP und IF (Acehan et al. 2008).

#### I.1.2.2 Funktion

Als essentielle Komponenten von Desmosomen gehört die Aufrechterhaltung der Zelladhäsion zu den Hauptaufgaben der Armadillo-Proteinfamilie. PG und PKP verlinken an der Plasmamembran verankerte desmosomale Cadherine mit DP.  ber die Verbindung von DP an IF stehen desmosomale Cadherine somit indirekt in Kontakt mit dem Zytoskelett. Die erhöhte Stabilität der Zellkontakte sch tzt das Gewebe vor mechanischen Scherkräften (Smith und Fuchs 1998, S. 1230; Hatzfeld et al. 2000, S. 217; Acehan et al. 2008). Die Bindestelle für desmosomale Cadherine befindet sich in der N-terminalen Domäne und in einigen Arm-Wiederholungen des PG (Chitaev et al. 1996). DP bindet an

die zentrale Armadillo-Domäne des PG (Kowalczyk et al. 1997; Bornslaeger et al. 2000). Desmosomale Cadherine treten über ihre N-terminale Domäne mit den PKPs in Kontakt (Hatzfeld et al. 2000; Hatzfeld 2007).

Die Aufgaben von PG umfassen neben der Zelladhäsion auch die Regulation des Aufbaus und der Größe der Desmosomen sowie der lateralen Assoziationen zwischen Desmosomen (Palka und Green 1997). Auch die Kommunikation zwischen den Desmosomen und Adhärenzverbindungen wird durch PG reguliert (Lewis et al. 1997; Ruiz et al. 1996; Palka und Green 1997). Die enge Verwandtschaft mit dem Armadilloprotein  $\beta$ -Catenin deutet darauf hin, dass PG möglicherweise auch die intrazelluläre Signalweiterleitung im Rahmen des Wnt-Wachstumsfaktor-Signalwegs beeinflusst. Der Wnt-Signalweg spielt in der Embryogenese und Zellentwicklung eine bedeutende Rolle und wird in bestimmten Tumorzellen aktiviert. Bei  $\beta$ -Catenin handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor. Bei inaktivem Wnt-Signalweg wird  $\beta$ -Catenin in einem Komplex aus verschiedenen Proteinen abgebaut. Nach Aktivierung des Wnt-Signalweges wird  $\beta$ -Catenin aus dem Proteinkomplex ins Zytoplasma freigesetzt, von wo aus es in den Zellkern gelangt. Dort geht es mit dem T-cell-factor (TCF) / Lymphoid enhancer factor (LEF) einen Komplex ein und aktiviert die Transkription beispielsweise von Transkriptionsfaktoren (MYC) und Zellzyklusproteinen (Cycline) (Zhurinsky et al. 2000; Klymkowsky et al. 1999).

Wie PG den Wnt-Signalweg beeinflusst, ist noch nicht abschließend geklärt. Möglicherweise steigert PG unabhängig vom  $\beta$ -Catenin die Transkription von bestimmten Genen (z. B. *MYC*). Auf der anderen Seite hemmt PG den Abbau von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma, wodurch größere Mengen des Transkriptionsfaktors zur Verfügung stehen. Darüber hinaus könnte PG in Adhärenzverbindung das  $\beta$ -Catenin ersetzen, was ebenfalls die Konzentration von  $\beta$ -Catenin im Zellkern erhöhen könnte (Zhurinsky et al. 2000; Maeda et al. 2004; Merriam et al. 1997; Huelsken und Behrens 2002). Einige Studien belegen auch eine Deaktivierung des Wnt-Signalwegs durch PG (Miravet et al. 2003; Miravet et al. 2002). Die Aktivierung von MYC und die Induktion des anti-apoptotischen Proteins B-cell-lymphoma-2 (Bcl-2) durch PG scheinen eine relevante Rolle bei der Tumorgenese zu spielen (Hakimelahi et al. 2000).

Als essentielle Bestandteile von Desmosomen (Hatzfeld 2007) steuern PKPs die Assemblierung von desmosomalen Bestandteilen. PKP1 spielt bei der Rekrutierung von DP und bei der Regulierung der Desmosomengröße eine Rolle (Hatzfeld et al. 2000; South et al. 2003; Kowalczyk et al. 1999). Über unterschiedliche Bindungsstellen in seiner N-termin-

nalene Domäne interagiert PKP1 mit der N-terminalen Domäne von DP und mit desmosomalen Cadherinen und verknüpft so letztere indirekt mit den IF (Kowalczyk et al. 1999). Zusammen mit PG stabilisiert PKP2 die desmosomalen Plaques, die sich in der Elektronenmikroskopie als äußere dunkle Verdichtung präsentieren (Bornslaeger et al. 2000). PKP2 interagiert über seine N-terminale Domäne mit verschiedenen desmosomalen Komponenten (Hatzfeld 2007) und spielt bei dem Transport von DP eine Rolle (Godsel et al. 2005). Auch PKP3 besitzt verschiedene desmosomale Bindungspartner. PKP2 und PKP3 scheinen ein Gerüst zu bilden, das die Interaktion zwischen desmosomalen Cadherinen und Plaque-Proteinen wie PG und DP ermöglicht (Hatzfeld 2007). Die Lokalisation von PKP1 und PKP2 im Zellkern deutet auf eine Rolle bei der Signaltransduktion hin. In Ko-Immünpräzipitationsexperimenten wurde bisherein Kontakt zwischen PKP2 und einer Untereinheit der RNA-Polymerase III beobachtet (Mertens et al. 2001). PKPs spielen darüber hinaus eine Rolle bei der Tumorphysion. PKP1 wird in Kopf-, Hals- und Plattenepithelkarzinomen überexprimiert (Villaret et al. 2000). In allen getesteten Adenokarzinomen wurde PKP2 gefunden (Mertens et al. 1999). Die Überexpression von PKP3 ist mit einer schlechteren Prognose bei Lungentumoren assoziiert (Furukawa et al. 2005). PKP3-RNA-Interferenz- und Überexpressionsexperimente belegen den tumorfördernden Effekt von PKP3 auf das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (Hatzfeld 2007).

### I.1.2.3 Dysregulation & Störungen

Bei der autosomal-rezessiv vererbaren Naxos-Krankheit kommt es zu einem Defekt im *PG*-Gen. Die Störung ist durch die Trias ARVC, wolliges Haar und palmoplantare Keratodermie charakterisiert (McKoy et al. 2000). *PG*-Knockout-Mäuse sterben meist an Tag 10,5 der embryonalen Entwicklung an schwerwiegenden Herzdefekten. Daneben zeigten diese Mäuse eine akanttholytische Hautfragilität. *PG*-Knockout-Mäuse zeigen erniedrigte DP- und PKP1- sowie erhöhte  $\beta$ -Catenin-Konzentrationen in ihren Desmosomen. Die interzellulären desmosomalen Cadherin-Wechselwirkungen schienen nicht beeinträchtigt zu sein. Elektronenmikroskopisch fielen eine blässere äußere Plaque-Verdichtung (*PG*, PKPs, DP) in der Nähe der Plasmamembran und eine fehlende innere Plaque-Verdichtung (DP, IF) auf. Zellkulturen, denen *PG* fehlte, waren anfälliger für mechanischen Stress. Diese Beobachtungen deuten auf eine essentielle Aufgabe von *PG* bei der Rekrutierung und Stabilisierung von Plaque-Komponenten und somit indirekt bei der Bindung der IF hin.

Defekte in *PKP1*- und *PKP2*-Genen werden mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Mutationen in dem *PKP1*-Gen führen zu einer ektodermalen Dysplasie. Diese auch unter Hautfragilitäts-Syndrom bekannte, autosomal-rezessive Erkrankung führt zur Blasenbildung, Hautbrüchigkeit und palmoplantaren Hyperkeratosen (McGrath et al. 1997). Weitere Symptome sind Wachstumsstörungen der Haare, Nageldystrophie und Anhidrose. *PKP1*-Knockout-Mäuse zeigen keine Verteilungsstörung desmosomaler Cadherinen und PG, aber die intrazelluläre Lokalisation von DP ist diffus, was auf eine essentielle Rolle des *PKP1* bei der Rekrutierung von DP hindeutet (Hatzfeld 2007). Mutationen im Gen für das ubiquitär in allen Desmosomen-tragenden Geweben exprimierte *PKP2*, das zugleich das einzige PKP im Herzmuskelgewebe darstellt, führen zu einer ARVC (Gerull et al. 2004; Syrris et al. 2006). *PKP2*-Knockout-Mäuse zeigen eine gestörte Herzmorphogenese, sowie eine reduzierte Trabekulation und Stabilität, die sich durch Störungen im Zytoskelett sowie durch Herzwandrupturen und Einblutungen in die Perikardhöhle äußert (Hatzfeld 2007). In Abwesenheit von *PKP2* akkumuliert DP im Zytoplasma und bildet körnige Aggregate. Embryonale Epithelien zeigen dagegen auch beim Fehlen von *PKP2* eine ordnungsgemäße Struktur und Verbindung von Desmosomen, was auf eine Kompensation durch andere PKPs zurückzuführen ist (Hatzfeld 2007).

### **I.1.3 Plakin Proteinfamilie**

#### **I.1.3.1 Vorkommen und Struktur**

Zur Plakin-Proteinfamilie gehören neben DP auch Plectin, Envoplakin und Periplakin (Bouameur et al. 2014). Als essentielle desmosomale Komponente kommt DP in allen Desmosomen-tragenden Geweben vor. Das Gen befindet sich auf Chromosom 6; von dem Protein gibt es zwei Spleiß-Varianten (DP1, DP2). DP besteht aus einer N-terminalen Plakin-Domäne, einer zentralen alpha-helicalen Coiled-coil Stabdomäne (Rod) und einer C-terminalen Domäne mit drei Plakin-Wiederholungs-Domänen sowie eine Glycine-Serin-Arginin (GSR) reiche Domäne (Abbildung 5). Die N-terminale Plakin-Domäne fungiert als Bindungsstelle für desmosomale Plaque-Proteine wie PKP und PG (Kowalczyk et al. 1997; Smith und Fuchs 1998; Troyanovsky et al. 1994b). Die zentrale Stabdomäne dient der Dimerisierung, während die C-terminale Domäne den Kontakt zu den IF herstellt (Getsios et al. 2004; Stappenbeck und Kathleen J. Green 1992).



**Abbildung 5: Struktureller Aufbau von Desmoplakin (DP)**

DP besteht aus einer N-terminalen Plakin-Domäne, einer zentralen alpha-helicalen Coiled-coil-Stabdomäne (Rod) und einer C-terminalen Domäne mit drei Plakin-Wiederholungs-Domänen sowie einer Glycin-Serin-Arginin (GSR) reiche Domäne.

### I.1.3.2 Funktion

Die Hauptaufgabe von DP ist die Herstellung der Verbindung zwischen den desmosomalen Plaque-Proteinen und den IF (Bornslaeger et al. 1996; Gallicano et al. 1998). DP-Knockout-Mäusen zeigen eine verringerte Anzahl von Desmosomen und versterben im Embryonalstadium (Bornslaeger et al. 1996). Weiterhin scheint DP am Kontakt zwischen Desmosomen und Adhärenzverbindung beteiligt zu sein. Eine Überexpression des N-terminalen Plakin-Domänen-Peptids (DP-NTP), das DP aus seinen Bindungen verdrängt, führt zur Auflösung der DP-IF-Verbindung sowie zu einer unkontrollierten Vermischung von desmosomalen- und Adhärenzverbindung-Proteinen. Weiter spielt DP eine Rolle bei der neuronalen Entwicklung. Mutationen im *DP*-Gen haben Defekte im axonalen Wachstum und eine neuronale Degeneration in Mäusen und Fliegen zur Folge (Delva et al. 2009).

### I.1.3.3 Dysregulation & Störungen

Defekte im DP haben Auswirkungen auf die Haut, die Haare und das Herz. Auslöser der striären palmoplantaren Keratodermie sind Defekte in Genen für desmosomale Cadherine, Armadillo-Proteine und DP. Symptome der Erkrankung sind streifige Hyperkeratosen, die sich in Handflächen und Fußsohlen manifestieren. Eine autosomal rezessiv vererbte Mutation im *DP*-Gen, die zum Verlust der C-Wiederholungen führt, wird durch eine Trias aus Kardiomyopathie, generalisierter Keratodermie und wolligen Haaren charakterisiert (Norgett et al. 2000). Beim paraneoplastischen Pemphigus führen Autoantikörper gegen Proteine der Plakin-Familie zu malignen Neoplasien und schweren mukokutanen Läsionen.

#### **I.1.4 Assemblierung und Desassemblierung**

Der Aufbau der Desmosomen ist ein multifaktoriell regulierter, mehrstufiger Prozess. Die Anwesenheit von klassischen Cadherinen ist für die Assemblierung und Reifung desmosomaler Komponenten im Trophoektoderm unverzichtbar (Green et al. 2010; Huber 2003; Rötzer et al. 2015). Desmosomale Cadherine werden über den klassischen Sekretionsweg im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, im Golgi-Apparat modifiziert und in Post-Golgi-Vesikeln sortiert. Im Anschluss daran gelangen sie zur Plasmamembran, wo sie in Desmosomen eingebaut werden (Green et al. 2010). Es wird angenommen, dass der Transport von Dsc2 an die Plasmamembran die Desmosomen-Assemblierung initiiert (Green et al. 2010). Desmosomale Cadherine werden durch die Dimerisierung ihrer C-terminalen Domänen an der Plasmamembran stabilisiert.

Da PG sowohl an Desmosomen als auch an Adhärenzverbindungen bindet, scheint es eine Rolle bei der Interaktion dieser beiden Zellkontakte zu spielen (Lewis et al. 1997). Zudem reguliert PG während der Assemblierung die Desmosomengröße (Palka und Green 1997), wohingegen PKP DP rekrutiert und die laterale Clusterbildung von desmosomalen Cadherinen vermittelt (Thomason et al. 2010). PKP und PG sind essentielle Strukturen für die Desmosomen-Assemblierung, da sie die desmosomalen Cadherine mit DP bzw. den IF koppeln (Thomason et al. 2010). Vermutlich werden die zytoplasmatischen Plaque-Proteine durch das Aktin-Zytoskelett zur Plasmamembran befördert (Godsel et al. 2005). Für den Transport von DPL zur Plasmamembran werden PKP2 und die PKC benötigt, die durch Phosphorylierung von DP und durch Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts den Transport zur Plasmamembran ermöglichen (Hatzfeld et al. 2000; Bass-Zubek et al. 2008). Die PKC spielt zudem eine entscheidende Rolle in der Modellierung von Desmosomen und der Erhalt der dynamischen Fähigkeit dieser Strukturen (Johnson et al. 2014), um auf Umweltreize reagieren zu können und sich der Umgebung anzupassen. Auf der einen Seite fördert die Aktivierung der PKC die Desmosomenbildung bei niedrigen Calciumkonzentration und in Abwesenheit von Adhärenzverbindungen. Auf der anderen Seite wird an Wundrändern die PKC aktiviert, um den hyperadhäsiven Zustand der Desmosomen aufzulösen und so die Zellmigration zu ermöglichen (Thomason et al. 2010). Darüber hinaus hängt die Rekrutierung von DP zudem vom intrazellulären Calciumspiegel ab (Dhitavat et al. 2003). Hohe extrazelluläre Calciumkonzentrationen induzieren die Assemblierung der desmosomalen Komponenten. Bei niedrigen extrazellulären Calciumkonzentration steigt dagegen der Umsatz von desmosomalen

Komponenten in den Desmosomen. Aufgrund dieses schnellen Umsatzes desmosomaler Cadherine wird die Existenz eines extradesmosomalen Pools an Cadherinen postuliert (Huber 2003). Weiterhin deutet eine Studie mit einer Plattenepithelkarzinom-Zelllinie daraufhin, dass das zur Plasmamembran transportierte Dsg3 sich dort zunächst in einem nicht-desmosomalen Pool ansammelt, der nicht an IF gebunden ist. In einem zweiten Schritt verknüpft DP, der an den IF gebunden ist, die desmosomalen Cadherine mit den IF (Demlehner et al. 1995). Halbdesmosomen gelten als Zwischenstufe der Desmosomen-Assemblierung. Halbdesmosomen, die an der Zelloberfläche nicht durch Wechselwirkungen mit benachbarten Zellen stabilisiert werden, werden abgebaut. Halbdesmosomen treten auch bei niedrigen extrazellulären Calciumkonzentration auf (Sato et al. 2000).

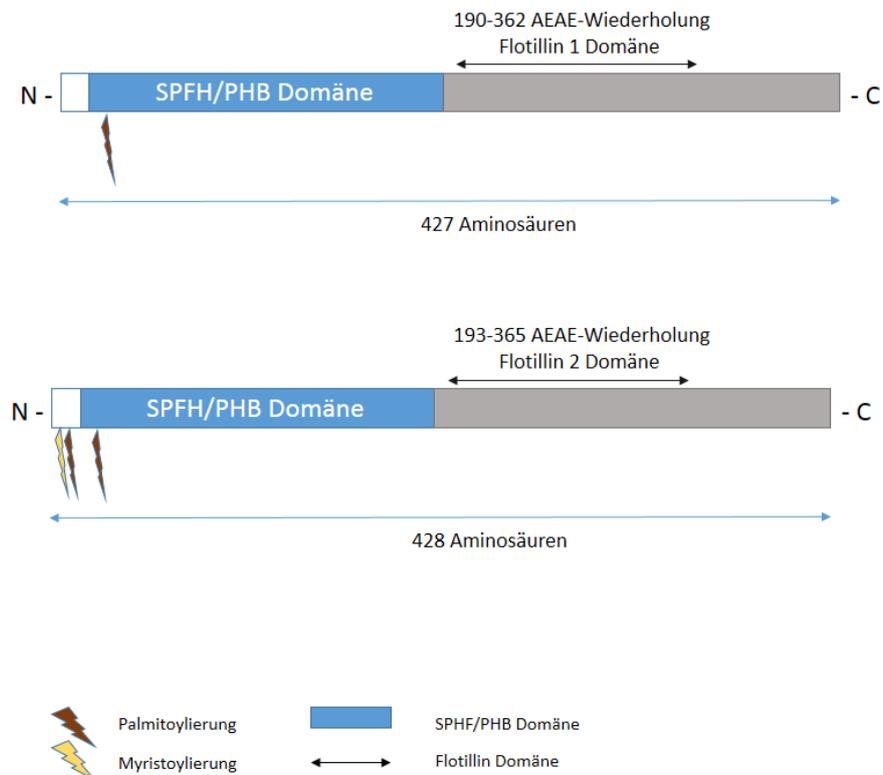
## I.2 Flotilline

Flotilline gehören zu der Stomatin-Prohibitin-Flotillin-HfIK/C-(SPFH)-Protein-Superfamilie. Die beiden homologen Proteine, Flotillin-1 und Flotillin-2, besitzen eine zu ca. 50% identische Aminosäuresequenz mit einer Molekülmasse von etwa 48 kDa und umfassen 427 bzw. 428 Aminosäuren (Browman et al. 2007; Edgar und Polak 2001; Schroeder et al. 1991; Schulte et al. 1997). Das Gen für *Flot-1* befindet sich auf Chromosom 6 und das Gen für *Flot-2* auf Chromosom 17. Die Proteine wurden ursprünglich in retinalen Ganglienzellen von Goldfischen entdeckt und als Reggie-1 (Flotillin-2) und -2 (Flotillin-1) bezeichnet (Schulte et al. 1997). Aufgrund ihrer Detergenzresistenz und ihrer Fähigkeit in Dichtegradienten zu schwimmen, wurden sie als Flot-1 und Flot-2 bezeichnet (Bickel et al. 1997).

### I.2.1 Vorkommen und Struktur

Flotilline enthalten in ihrer N-terminalen Sequenz eine SPFH-Domäne und im C-terminalen Anteil eine Flotillin-Domäne (Alanin-Glutamat-Wiederholungen, Abbildung 6). Die SPFH-Domäne besitzt hydrophobe Sequenzen mit Acylierungsstellen für die posttranslationale Fettsäuremodifikation und Membranassoziation (Neumann-Giesen et al. 2004; Morrow et al. 2002). Die posttranslationale Fettsäuremodifikation der Flotilline ist verschieden. Flot-1 besitzt mit einem Cystein an Position 34 eine Acylierungsstelle, an die Palmitinsäure angehängt wird. Flot-2 verfügt über vier Acylierungsstellen (Myristylierung an Position 2 (Glycin); Palmitoylierung an Position 4, 19 und 20 (Cysteine))

(Neumann-Giesen et al. 2004). Diese posttranslationalen Modifikationen sind essentiell für die Verankerung der Flotilline an der Plasmamembran. Der C-terminale Anteil ist für die Hetero- und Homooligomerisierung der Flotilline verantwortlich, die bei der Endozytose und Membranassoziation der Flotilline eine Rolle spielen (Babuke et al. 2009; Solis et al. 2007). Darüber hinaus enthalten Flotilline putative Phosphorylierungsstellen (Flotillin-1: Tyrosin an Position 160; Flotillin-2: Tyrosin an Position 163) (Neumann-Giesen et al. 2007; Solis et al. 2007; Riento et al. 2009).



### Abbildung 6: Struktureller Aufbau von Flotillin 1 und 2

Flot-1 besteht aus 427 Aminosäuren und Flot-2 aus 428 Aminosäuren mit einem N-terminalen und einem C-terminalen Anteil. Im N-terminalen Anteil befindet sich die SPFH-Domäne, die hydrophobe Sequenzen mit Acylierungsstellen besitzt. Im C-terminalen Anteil befindet sich die Flotillin-Domäne, die sich aus Alanin und Glutamat Wiederholungen zusammensetzt. Flot-1 und 2 besitzen unterschiedliche posttranslationale Fettsäuremodifikation (Palmitoylierung und Myristoylierung) und unterschiedliche Phosphorylierungsstellen.

Flotilline sind nahezu ubiquitär in vielen Geweben (z.B. in Herz, Lunge, Plazenta, Gehirn) verbreitet (Edgar und Polak 2001). Sie sind an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert, können aber auch in Lysosomen, Endosomen, Phagosomen und

Exosomen (Stuermer et al. 2001; Gassart et al. 2003; Dermine et al. 2001) oder in Zellkontakt-Strukturen (Neumann-Giesen et al. 2004) auftreten. Flot-1 kommt darüber hinaus im Golgi-Apparat und im Zellkern vor (Gkantiragas et al. 2001; Santamaría et al. 2005). Die Lokalisation der Flotilline hängt vom Zelltyp, dem Differenzierungsgrad der Zellen und *in vitro* auch von den Kulturbedingungen ab. In differenzierten Zellen befinden sich Flotilline eher an der Plasmamembran und in undifferenzierten Zellen eher in intrazellulären Kompartimenten (Kurrle et al. 2013b; Langhorst et al. 2008; Ha et al. 2003a). Des Weiteren wird die Lokalisation von Flotillinen in Keratinozyten neben der Calciumkonzentration und Differenzierungsgrad auch von der verwendeten Zelllinie beeinflusst, z.B. in immortalisierte humane hTert/KER-CT-Keratinozyten (hTert-Zellen) befinden sich Flotilline unter niedriger Calciumkonzentration eher in intrazellulären Strukturen und erst ab einer Calciumkonzentration von 2mM verlagert sich Flot-2 an der Plasmamembran. Dahingegen ist in HaCaT Zellen Flot-2 erst bei konfluent dicht gewachsenen Zellen an der Plasmamembran zu finden (Beckert et al. 2019; Völlner et al. 2016).

### I.2.2 Funktion

Flotilline besitzen diverse Funktionen. Sie sind an der Endozytose, an der intrazellulären Signaltransduktion und an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt (Otto und Nichols 2011). Obwohl die Beteiligung von Flotillinen an der Endozytose immer noch kontrovers diskutiert wird, haben viele Studien einen Zusammenhang bestätigt (Meister und Tikkanen 2014; Otto und Nichols 2011). Die Beteiligung von Flotillinen an mehreren Signalwegen der Zelle wird in verschiedenen Studien bestätigt. Bei der Axonregeneration nach einer Verletzung des Sehnervs in Goldfischen, wurde eine erhöhte Expression von Flotillinen beobachtet (Schulte et al. 1997; Lang et al. 1998). Auch bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten (Bickel et al. 1997) und bei der Differenzierung von Osteoklasten und Skelettmeyoblasten (Ha et al. 2003b; Volonté et al. 1999) kommt es zu einer gesteigerten Flotillin-1-Expression. Diese Befunde sprechen für eine Beteiligung der Flotilline an der Differenzierung und Regeneration von Geweben (Langhorst et al. 2005). Studien belegen, dass Flotilline an den Signalwegen verschiedener Hormone / Wachstumsfaktoren (z.B. Insulin, Nerve-growth-factor, Fibroblast-growth-factor und Epidermal-growth-factor (EGF) beteiligt sind (Neumann-Giesen et al. 2007; Baumann et al. 2000; Limpert et al. 2007; Tomasovic et al. 2012).

Neben der klassischen Signalkaskade über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) wird nach Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor ein zweiter Signalweg unter Beteiligung von Membranrafts und Flotillinen aktiviert (Otto und Nichols 2011). Dabei bildet Flot-1 einen Komplex mit der E3-Ubiquitin-Protein-Ligase cCbl und dem cCbl-assoziierten Protein (CAP). Dieser Komplex aktiviert die Rho GTPase RHOQ, was zur Translokation des Glukosetransporters GLUT4 aus den intrazellulären Speichern zur Plasmamembran und zur Glukoseaufnahme führt (Baumann et al. 2000; Kimura et al. 2001). Hydrophobe Sequenzen des Flot-1 binden dabei an die Sorbin-Homologie-(SoHo)-Domäne im CAP (Baumann et al. 2000; Liu et al. 2005). SoHo-Domänen kommen auch in anderen Adaptorproteinen (z.B. ArgBP2, Vinexin) vor, die an der Modellierung des Aktin-Zytoskeletts und an weiteren Signalwegen beteiligt sind (Kioka et al. 2002).

Flotilline beeinflussen auch den EGF-Rezeptor-Signalweg und den damit verbundenen Mitogen-activated-protein-(MAP)-Kinase-Signalweg. Flot-1 ist an der EGF-Rezeptor-Autophosphorylierung und Clusterbildung beteiligt. Eine Stimulierung des EGF-Rezeptors führt zudem zur Phosphorylierung und Endozytose von Flot-2, das zusammen mit dem EGF-Rezeptor von der Plasmamembran in späte Endosomen transportiert wird (Neumann-Giesen et al. 2007). Flot-2 wird durch Kinasen der Src-Familie (z.B. Fyn) phosphoryliert (Riento et al. 2009; Neumann-Giesen et al. 2007). Im Rahmen des MAP-Kinase-Signalwegs interagiert Flot-1 mit c-Raf, MEK1 und ERK2 (Amaddii et al. 2012; Meister et al. 2013).

Flot-2 ist an G-Protein-gekoppelten Signalwegen beteiligt, wie die Ko-Immünpräzipitation mit dem Thrombin-Rezeptor PAR zeigt (Hazarika et al. 2004). Darüber hinaus spielen Flotilline bei der Aktivierung von T-Zellen eine Rolle (Rajendran et al. 2009; Rossy et al. 2009; Sánchez-Madrid und Serrador 2009).

### I.2.3 Interaktion mit Zellkontakten

Die Rolle der Flotilline bei Zellkontakten wird durch die Ko-Lokalisation von Adhäsionsmolekülen und Flotillinen in Flotillin-Membranrafts und in Zellkontakt-Strukturen deutlich. In humanen Nierenzellen (Roitbak et al. 2005) und Kolonkarzinom-Zellen (HAT-29) (Chartier et al. 2011) befindet sich ein Teil des endogenen E-Cadherins und  $\beta$ -Catenins in Flotillin-Rafts. In Brustepithelzellen (MCF10A) wurde in Flotillin-Rafts E-Cadherin und PG ( $\gamma$ -Catenin) gefunden (Kurrle et al. 2013b). Des Weiteren scheinen auch

desmosomale Cadherine teils in Flotillin-Membranrafts lokalisiert zu sein (Resnik et al. 2011; Völlner et al. 2016). Darüber hinaus bilden Adhäsionsproteine wie E-Cadherine, N-Cadherine, verschiedene Catenine und Flotilline ko-präzipitierbare Proteinkomplexe (Bodrikov et al. 2011; Guillaume et al. 2013; Kurrle et al. 2013b).

Eine Flotillin-Depletion führt zu einer Störung der Struktur und Anordnung der Adhärenzverbindung und somit der Zellkontakte (Guillaume et al. 2013; Solis et al. 2012). Verschiedene Studien belegen eine verminderte Adhäsionsstärke und herabgesetzte Aggregations-Fähigkeit der Zellen untereinander (Guillaume et al. 2013; Solis et al. 2012). Eine mögliche Erklärung ist ein unkoordinierter, basaler / apikaler Transport von E-Cadherinen entlang der Membran nach Flot-2-Depletion (Solis et al. 2012). In MCF-7-Brustkrebszellen und Epithelzellen mit einer Flot-1- oder -2-Depletion ist die E-Cadherin-Expression herabgesetzt. Zusätzlich ist die p120-Catenin-Menge in MCF-7-Brustkrebszellen reduziert (Chartier et al. 2011; Kurrle et al. 2013b; Solis et al. 2012). Dagegen führte in MCF-10A-Brustepithelzellen eine Flot-1-Depletion zu keiner Veränderung der E-Cadherin-Expression (Guillaume et al. 2013; Kurrle et al. 2013b), was darauf hinweist, dass Flotilline Zellart-spezifische Funktionen besitzen. Auch die PG-Menge nimmt in verschiedenen Zellen bei Flot-2-Depletion ab. Da PG im Gegensatz zu den anderen Adhäsionsproteinen ein essentielles Protein in Desmosomen darstellt, belegt dieser Befund die Verbindung zwischen Desmosomen und Flotillinen. Inzwischen konnte die Bindungsstelle von Flotillin in PG genauer identifiziert werden (Kurrle et al. 2013b). In der Studie von Kessler et al wurde zudem das Vorhandensein von Flotillinen in sogenannten interkalierenden Scheiben, Zellverbindungen zwischen benachbarten Herzmuskelzellen, beschrieben. Hier wird den Flotillinen eine regulatorische Rolle zugeschrieben, indem sie die Erregbarkeit der Herzmuskelzellen beeinflussen (Kessler et al. 2019).

### **I.3 Ziele dieser Arbeit**

Desmosomen sind essentielle Strukturen bei der Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität. Desmosomale Störungen rufen schwerwiegende Erkrankungen wie Pemphigus vulgaris und ARVC hervor. Daher ist die Analyse der Interaktionspartner auch von klinischer Bedeutung. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Interaktion zwischen Flotillinen und desmosomalen Zelladhäsionsproteinen. Die signifikante Abnahme des Dsg3-Proteingehalts in Flotillin-Knockdown-Zellen belegt den Zusammenhang zwischen Flotillinen und dem

Expressionsniveau von Dsg3 (Völlner et al. 2016). Darauf aufbauend stellt sich die Frage, wie Flotilline die Expression von Dsg3 und möglicherweise von weiteren desmosomalen Adhäsionsproteinen beeinflussen, und ob Flotilline am Aufbau und / oder Abbau von desmosomalen Proteinen beteiligt sind. Zur Beantwortung der Fragen sollte die Expression von desmosomalen Adhäsionsproteinen in Flotillin-Knockdown-Zellen analysiert werden.

## II Material und Methoden

### II.1 Material

#### II.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

In Tabelle 1 und Tabelle 2 sind alle technischen Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgelistet, die für die Durchführung der Experimente benötigt wurden.

**Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte mit Hersteller Angaben**

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Elektrische Pipettierhilfe accu jet R	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim (D)
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg (D)
Vortex Bio Vortex VI	PEQLAB Erlangen (D)
Heizblock	Laborgeräte München (D)
Airflow Control (EN 14175)	WALDNER Inc., MA (USA)
MonoBloc Chemikalienwaage Toledo PB602-S	Mettler-Toledo GmbH, Gießen (D)
Schwenktisch (WS-10)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen (D)
Spektralphotometer Biophotometer Plus	Eppendorf, Hamburg (D)
Schüttler (Polymax 1040)	Heidolph Instruments GmbH, Schwalbach (D)
<b>Zellkultur</b>	
Sterilbank	Thermo Scientific, St. Leon-Rot (D)
Neubauer Zählkammer	Optik Labor, Bad Homburg (D)
Incucell Bakterien-Inkubator	Sanyo, München (D)
Lichtmikroskop (AE 31)	Motic, Wetzlar (D)
Fluoreszenzmikroskop LSM T-PMT 710	Carl Zeiss, Göttingen (D)
Brutschrank Sanyo CO <sub>2</sub> Incubator	Sanyo North America Corporation, San Diego (USA)
<b>Zentrifugen</b>	
Mikro 22R	Hettich, Kirchlingern (D)
Mikro 22R	Hettich; Tuttlingen (D)
<b>Gelelektrophorese</b>	
Spannungsquelle (Electrophoresis Power Supply, EPS 301)	Amersham Bioscience, Freiburg (D)
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	neoLab, Heidelberg (D)
SDS-PAGE Kammer	Amersham Bioscience, Freiburg (D)
<b>Western-Blot</b>	
Filmentwicklermaschine (Curix 60)	AGFA, Düsseldorf (D)
Western Blotssystem Criterion Blotter	Bio Rad Laboratories GmbH, München (D)
Scanner Epson Perfection 3200 Photo	Epson Deutschland GmbH, Meerbusch (D)

**Tabelle 2: Auflistung der Verbrauchsmaterialien mit Hersteller Angaben**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Filme Super RX Fuji medical X-ray Films, 100 NIF	Fuji, Düsseldorf (D)
Frischhaltefolie	Papstar, Kall (D)
Falcon Röhrchen (15cm, 50cm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)
Glas-Pasteur-Pipetten	VWR International, Darmstadt (D)
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Nitrocellulose-Membran (Whatman Protran)	Whatman, Dassel (D)
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Plastikpipetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (D)

Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Brampton (CAN)
Röntgenfilm (Super RX Fuji medical X-ray Films)	FUJIFILM, Düsseldorf (D)
Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Zellkulturplatten (6-well, 12-well)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht (D)

## II.1.2 Chemikalien und Puffer

Die benötigten Chemikalien sind in Tabelle 3 aufgelistet. Tabelle 4 führt die verwendeten Lösungen und deren Herstellung.

**Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien**

Bezeichnung	Hersteller
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Merck, Darmstadt (D)
Acrylamid	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe (D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe (D)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe (D)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe (D)
Bradford Reagenz	Bio Rad Laboratories GmbH, München (D)
Cumarinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (D)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Life Technologie GmbH, Darmstadt (D)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Life Technologie GmbH, Darmstadt (D)
Essigsäure (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (D)
ECL western blotting detection reagents	GE Healthcare, München (D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Ethanol	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe (D)
Filmentwickler Unimatic C	Calbe Chemie GmbH, Calbe (D)
Filmfixierer Unimatic F	Calbe Chemie GmbH, Calbe (D)
Fötales Kälberserum (FBS)	Life Technologie GmbH, Darmstadt (D)
Glycerin	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe (D)
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Luminol	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)

Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Milchpulver, fettfrei	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe (D)
Natriumazid	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe (D)
Natriumhydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe (D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe (D)
NEAA (Non-essential amino acids)	Life Technologie, Darmstadt (D)
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (D)
Ponceau S	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Proteingrößenstandard Precision Plus Protein™ Standard Dual Color	Bio Rad Laboratories GmbH, München (D)
Proteinase Inhibitor Cocktail (PI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe (D)
Tris-Base	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe (D)
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe (D)
Trypsin	Life Technologies, Darmstadt (D)
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung**

<b>Puffer/Lösungen</b>	<b>Herstellung/Zusammensetzung</b>
Blocklösung für Membranen	5% fettarmes Milchpulver 1 x TBST
Blotpuffer (1x)	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 10% Methanol
Enhanced Chemilumineszenzlösung (ECL)	1.25 mM Luminol 200 µM Cumarinsäure 100 mM Tris-HCl pH 8,5 frisch hinzugegeben: 1/1000 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Ladepuffer (4 x)	250 mM Tris, pH 6,8 8% SDS 40% Glycin 0,4% Bromphenolblau 100 mM DTT β-Mercaptoethanol 20% β-Mercaptoethanol
Lämmli-Gelelektrophorese Laufpuffer (1 x)	0,192 M Glycin 25 mM Tris-Base 0,1% SDS
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (1 x)	150 mM NaCl 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4
Ponceau Lösung	0,2% Ponceau

	5% Essigsäure
Stripping Puffer	0,1 M NaOH
Stürmer Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 0,15 M NaCl 2 mM EDTA pH 8 1% NP-40
Tris-Puffer mit Tween-20 (TBS-T) (1 x)	10 mM Tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl 0,05% Tween 20
Zellkultur Medium	DMEM(Dulbecco's modified eagle medium) 10% FBS (Fötales Kälberserum) 1% Penicillin 1% Streptomycin 1% NEAA (Non-Essential-Amino-Acid) 1% Sodium pyruvate

### II.1.3 Antibiotika

Für die Durchführung einiger Experimente wurden Antibiotika eingesetzt. Zudem waren Antibiotika Bestandteil des Zellkultur-Mediums. Die Tabelle 5 enthält die verwendeten Antibiotika während der experimentellen Arbeit.

**Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Antibiotika**

Bezeichnung	Verwendung	Konzentration	Hersteller
Bafilomycin A	Experiment Bafilomycin A	50 nM	Sigma-Aldrich
Cycloheximid	Experiment Cycloheximid	10 µg/ml	Sigma-Aldrich
Penicillin	Zusatz Medium	1%	GE Healthcare, München (D)
Puromycin	Zusatz Medium	2 µg/ ml	GE Healthcare, München (D)
Streptomycin	Zusatz Medium	1%	Life Technologies, Darmstadt (D)

### II.1.4 Antikörper

Tabelle 6 führt die verwendeten Primärantikörper auf und Tabelle 7 die Sekundärantikörper.

**Tabelle 6: Auflistung der Primärantikörper**

Antigen	Wirt	Anwendung Western Blot	Anwendung IF	Hersteller
γ-Catenin	Maus	1:2500	1:250	BD
Desmoglein 1	Maus	1:1000	1:100	BD

Desmoglein 2	Maus	1:1000	-	Santa Cruz
Desmoglein 3	Maus	1:500	1:100	AbD Serotec
Desmoplakin	Kaninchen	X:500	1:50	Santa Cruz
Flotillin-2	Maus	1:50	1:1000	BD
Flotillin-1	Maus	1:50	1:1000	BD
GAPDH	Maus	1:10000	-	Abcam

**Tabelle 7: Auflistung der Sekundärantikörper**

Antikörper	Wirt	Verdünnung Western Blot	Verdünnung IF	Hersteller
Anti Kaninchen Alexa Fluor 488	Esel	-	1:300	Jackson Immuno- Research
Anti Kaninchen HRP	Ziege	1:10000	-	Dako
Anti Maus Cy3	Ziege	-	1:300	Jackson Immuno- Research
Anti Maus HRP	Ziege	1:10000	-	Dako

### II.1.5 Humane Zelllinie

In dieser experimentellen Doktorarbeit wurden HaCaT-Zellen verwendet (Boukamp et al. 1988). Es sind humane, spontan immortalisierte Keratinozyten, die adhären an der Oberfläche des Kulturgefäßes wachsen und haften bleiben. HaCaT steht für Human adult low Calcium high Temperature keratinocytes. Es sind epidermale Zellen, die aus der Peripherie eines primären malignen Melanoms eines 62-jährigen Patienten stammen. Zudem sind es adhärenente spontan transformierte Zellen, die als nicht maligne eingestuft werden. Aufgrund der aufgeführten Eigenschaften lassen sich HaCaT-Zellen über mehrere Passagen kultivieren.

Um die Rolle der Flotilline beim Auf- und Abbau der desmosomalen Zelladhäsionsproteine zu untersuchen, sind Wildtypzellen sowie stabile Flot-1 und Flot-2 Knockdown Zellen verwendet worden, bei denen die Expression von Flot-1 und Flot-2 durch lentivirale shRNAs herunter reguliert worden sind (Kurrle et al. 2013a)

Folgende Zellgruppen aus der HaCaT Zelllinie wurden für die Experimente eingesetzt:

- shControl (Kontrollzellen)

- F1-shRNA (Flotillin-1-Knockdown-Zellen)
- F2-shRNA (Flotillin-2-Knockdown-Zellen)

### II.1.6 Programme für statistische Analyse, Bild- und Textbearbeitung

In Tabelle 8 sind Computerprogramme und Software aufgelistet, die für die statistische Auswertung, Textverarbeitung und Erstellung von Abbildungen verwendet worden sind.

**Tabelle 8: Verwendete Computerprogramme und Software**

Bezeichnung	Funktion	Hersteller
CorelDRAW X7	Erstellung von Immunfluoreszenz- und Western Blot Abbildungen	Corel Deutschland GmbH, Unterschleißheim (D)
GraphPad Prism 6	Erstellung von Graphen und Statistische Analyse	GraphPad Software Inc., San Diego, CA (USA)
Microsoft Office 2013	Textverarbeitungsprogramm, Tabellenkalkulation	Microsoft Corporation
Zen 2.1 (black edition)	Immunfluoreszenz Dateien bearbeiten und TIF Dateien Exportieren	Carl Zeiss Microscopy, GmbH, München (DE)

## II.2 Methoden

### II.2.1 Zellbiologische Standardmethoden

#### II.2.1.1 Kultivierung von HaCaT Keratinozyten

Die Kultivierung von HaCaT Zellen erfolgte in T25 Zellkulturflaschen bei 37°C, 8% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Als Medium wurde Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit folgenden Zusätzen verwendet:

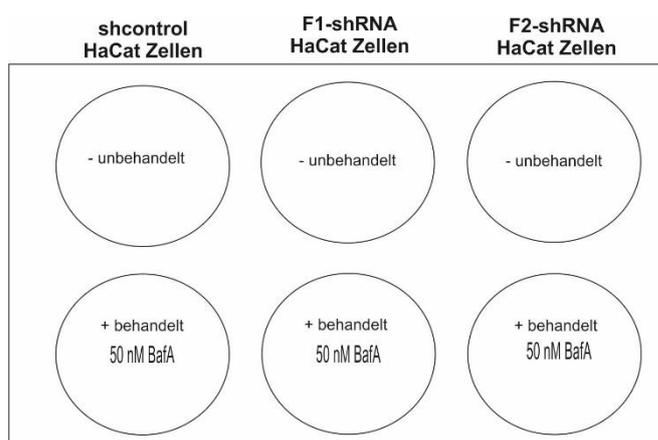
10% Fötale Kälberserum (FCS), 1% Penicillin, 1% Streptomycin, 1% *Non essential amino acids* (NEAA), Pyruvat und 2 µg/ml Puromycin. Da die Zellen adhärent wuchsen und sich ein Zellverband auf dem Boden der Zellkulturflasche bildete, wurde die Dichte des Zellrasens täglich unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Ein Mediumwechsel wurde dann durchgeführt, wenn tote Zellen entfernt werden sollten oder die Farbe des Mediums von rot/orange auf gelb/orange wechselte.

### II.2.1.2 Schritte Passagieren der HaCaT-Zellen

- Erreichen einer Konfluenz von ca. 100% in einer Zellkulturflasche
- Verwerfen des Mediums und Waschen der Zellen mit 5 ml 1x PBS
- Zugabe von 3 ml 0,05% EDTA in PBS, 15 min Inkubation, danach verwerfen
- Zugabe von 1 ml 1xTrypsin, 5min bei 37°C inkubieren
- je nach gewünschter Verdünnung der Zellen wird die Trypsinierung mit der jeweiligen Menge Medium (DMEM) gestoppt
- 1 ml von der Verdünnung in die Zellkulturflasche überführt und jeweils 5 ml DMEM dazugegeben
- Die Zellkulturflasche wurde im Brutschrank bei 37°C bis zur nächsten Passage weiter kultiviert.

### II.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Behandlung mit Bafilomycin A und Cycloheximid

Nachdem Passagieren wurden die restlichen HaCaT-Zellen für Experimente eingesetzt. Erster Schritt dabei war die Zellzählung, um die unterschiedlichen Zelllinien gleichmäßig auszusäen. Dazu wurden jeweils 10 µl der verdünnten Zellen auf eine Neubauer Zählkammer pipettiert, um dann die Zellen manuell zu zählen. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde anschließend die Zellzahl pro Milliliter in der Probe bestimmt. Für das Bafilomycin A-Experiment wurden 6 Well-Platten verwendet. In jedem Well wurde eine Zellzahl von  $4 \times 10^5$  Zellen/ Well ausgesät. In diesem Experiment wurden 3 unterschiedliche HaCaT-Zellproben eingesetzt: Kontrollzellen (shControl), Flotillin-1-Knockdown (F1-shRNA) und Flotillin-2-Knockdown (F2-shRNA) Zellen (Abbildung 7). Nachdem die Zellen konfluent wuchsen und sich ein Zellrasen auf der Well-Platte gebildet hat, wurde ein Mediumwechsel mit DMEM durchgeführt. Jede Zellprobe wurde unbehandelt (nur Medium) und behandelt (Zusatz von Bafilomycin A oder Cycloheximid) ausgesät.



**Abbildung 7: 6-Well-Platte zur Darstellung des Bafilomycin A Experiments**

Es sind drei unterschiedliche HaCaT Zellproben zu unterscheiden, die jeweils in 2 Wells verteilt sind. In jedem Well befinden sich insgesamt 2ml DMEM Medium mit  $4 \times 10^5$  Zellen/ Well. Im Verlauf des Experiments wird jeweils ein Well von jeder Zellprobe mit Bafilomycin A behandelt.

## II.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### II.2.2.1 Herstellung von Proteinlysaten aus HaCaT-Zellen

Die Proteinlysate wurden aus konfluent gewachsenen Zellen einer 6-Well-Platte hergestellt. Alle Schritte bei der Herstellung wurden auf Eis durchgeführt, um den Abbau der Proteine zu vermeiden. Zuerst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit jeweils 2 ml PBS gewaschen. Anschließend versetzte man diese mit 200  $\mu$ l Lysepuffer und inkubierte die Zellen für 20 min auf Eis auf einem Schwenktisch. Daraufhin wurden die lysierten Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Der nächste Schritt bestand aus der Zentrifugation des Zelllysates bei 4°C, 16000 RPM für 10 min. Danach wurde der Überstand, indem sich die Proteine befanden, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet, bestehend aus Zellresten, verworfen. Nun konnte die gewonnene Proteinkonzentration mithilfe der Bradford-Proteinbestimmung (Abschnitt 2.2.2.2) festgestellt werden.

### II.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Nach der Bradford-Methode wurden in einer Plastikkuvette 800  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 200  $\mu$ l Bradford Reagenz und jeweils 1  $\mu$ l Probe bzw. als Kontrolle 1  $\mu$ l Lysepuffer überführt. Im Anschluss daran wurde diese Zusammensetzung gut vermischt und im Photometer bei

einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Jede der sechs Proben enthielt eine gewisse Menge Protein die vom Photometer als Absorption erfasst und aufgrund der Standardkurve aus Rinderalbumin (BSA) bestimmt wurde. Damit die einzelnen Proben untereinander vergleichbar waren, wurde in allen Experimenten die gleiche Proteinmenge verwendet.

### II.2.2.3 SDS PAGE

Um die Zusammensetzung des Proteinlysates untersuchen zu können, wurde das Lysat mithilfe von Natrium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS PAGE) aufgetrennt. Hierfür wurden die Proben auf die gleiche Proteinkonzentration gebracht und anschließend mit einem 4-fachen Ladepuffer versetzt. Da die Gelelektrophorese nach Lämmli unter denaturierenden Bedingungen stattfand, wurden die vorbereiteten Proben samt Ladepuffer 5 min bei 94°C in einem Heizblock erhitzt. Aufgetragen wurden die Proteinproben auf ein Gel bestehend aus 4% Sammelgel und 10% Trenngel. Tabelle 9 führt die Herstellung der Polyacrylamid Gele auf.

**Tabelle 9: Sammel- und Trenngel Zusammensetzung**

<b>Komponente</b>	<b>4% Sammelgel Volumen in ml</b>	<b>10% Trenngel Volumen in ml</b>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	11,7 ml	21
<b>3 M Tris-HCl pH 8,8</b>	-	5
<b>3 M Tris-HCl pH 6,8</b>	0,624 µl	-
<b>20% SDS</b>	0,750 µl	0,200
<b>Acrylamid</b>	2,55 ml	13,4
<b>10% APS</b>	0,075 µl	0,400
<b>TEMED</b>	0,0225 µl	0,064
<b>Gesamt</b>	15	40

Dabei war die aufgetragene Proteinmenge aller Proben identisch. Im Sammelgel wurden die Proben auf eine bestimmte Höhe gesammelt, bevor sie ins Trenngel übergehen und dort nach ihrer Größe aufgetrennt wurden. Die aufgetragenen Proteine wurden nach der Größe aufgetrennt, da durch das Detergenz SDS die Proteine eine einheitliche negative Ladung trugen.

Neben den Proben wurden zusätzlich 2 µl des Markers Precision Plus Protein Standard Dual Color in das Gel geladen, um die Größe der aufgetrennten Proteine zuzuordnen zu

können. Die Gelelektrophorese wurde bei Raumtemperatur in einer Gelkammer gefüllt mit 1xLämmli-Ladepuffer durchgeführt. Dabei lag die Stromstärke anfangs bei 15 mA pro Gel. Sobald sich die Proben im Trenngel befanden, erhöhte man die Stromstärke auf 25 mA.

#### II.2.2.4 Western Blot

Im Western Blot wurden die aufgetrennten Proteine von einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dabei befand sich das Gel und die Nitrozellulosemembran in einem Kunststoffgitter, das von jeder Seite mit einem Schaumpolster und Filterpapier bedeckt war. Zuvor wurden das Gel, die Nitrozellulosemembran, die beiden Filterpapiere und das Schaumpolster in einem mit Blotpuffer gefüllten Behälter getränkt. Anschließend wurde das Kunststoffgitter mit den mit Blotpuffer getränkten oben aufgeführten Materialien und einem Kühlakku in eine Blotkammer überführt. Die Blotkammer wurde mit 1x Blotpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte dann bei 400 mA für zwei Stunden. Um den Erfolg des Transfers zu überprüfen, wurde die Membran nach dieser Zeit mit einer Ponceau-Lösung getränkt. Dabei wurden die übertragenen Proteine angefärbt und sichtbar gemacht.

Um die Färbung auszuwaschen, wurde die Membran mit TBST gewaschen. Dies war möglich, weil sich Ponceau reversibel an die positiv geladenen und unpolaren Gruppen der Aminosäuren bindet.

#### II.2.2.5 Immundetektion

Die Immundetektion ermöglicht es, die gewünschten Proteine auf der Membran sichtbar zu machen. Zunächst wurden die unspezifischen freien Bindungsstellen an der Membran durch eine Blocklösung, bestehend aus 5% Milchpulver und 1x TBST, 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Nach einmaligem Waschen mit 1xTBST wurde die Membran mit einer 10 ml Primär Antikörper Lösung bei 4°C über Nacht inkubiert.

Im Anschluss an der Inkubation wurde die Membran 3 x mit 10 ml TBST gewaschen und anschließend mit einem sekundären Antikörper für eine Stunde versetzt. Der sekundäre Antikörper war mit einer Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt. Bei den sekundären Antikörpern unterscheidet man je nach Herkunftsorganismus HRP-anti Maus und HRP-anti-Kaninchen. Wenn der verwendete primäre Antikörper aus der Maus gewonnen wurde, dann sollte der sekundäre Antikörper gegen Maus gerichtet sein (HRP-anti Maus).

Nach der Inkubation wurde wieder mit 10 ml TBST 3 x gewaschen, um überschüssigen sekundären Antikörper zu entfernen.

Um nun die Detektion durchzuführen und somit die Peroxidasereaktion in Gang zu setzen, wurde 1 ml ECL Lösung und 1  $\mu$ l 10%iges  $H_2O_2$  auf der Membran verteilt. Nach zweiminütiger Einwirkzeit wurde die Lösung abgetupft und die Membran, in einer Folie gewickelt, in eine Filmkassette überführt. In der Dunkelkammer wurde nun ein Super RX-Röntgenfilm auf die Membran gelegt und die Membran, abhängig von der Stärke des Signals, zwischen 1 Sekunde bis zu 30 Minuten auf dem Film exponiert. Schließlich wurde der Film in einem Entwicklungssystem (Detektor Curix 60) eingelegt um ihn dann maschinell zu entwickeln.

#### II.2.2.6 Strippen

Um die gebundenen Antikörper aus der Membran zu waschen, wurde diese mit 10 ml 0,1% NaOH Lösung für 20 min versetzt. Nach der Inkubation mit NaOH wurde die Membran mit 1 x TBST gewaschen und anschließend wurden die wieder freien Bindungsstellen mit Blocklösung blockiert. Die Membran war nun bereit, mit einem weiteren Primäantikörper behandelt zu werden.

### II.2.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Die Immunfluoreszenzfärbung begann mit der Kultivierung von HaCaT-Zellen auf Deckgläsern in einer 12-Well-Platte. Pro Well waren ca.  $2 \times 10^5$  Zellen, die in 1 ml DMEM im Brutschrank kultiviert wurden. Erreichten die Zellen eine Konfluenz von ca. 80%, so wurden sie mit MeOH fixiert, indem das Medium abgesaugt wurde, mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 8 min  $-20^\circ\text{C}$  kaltes MeOH pro Well hinzugegeben wurde. Nach der Fixierung wurden die freien Bindungsstellen der Proteine in den Zellen für 15 min mit 0,5 ml 1% BSA in 1 x PBS blockiert. Daraufhin wurden die Zellen für eine Stunde mit der verdünnten primären Antikörper-Lösung (Tabelle 6) inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen 3 x mit 1 x PBS gewaschen um danach für eine Stunde mit den verdünnten sekundären Antikörpern (Tabelle 7) inkubiert. Nach der letzten Antikörper-Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1 ml 1 x PBS gewaschen und zuletzt mit 1 ml ddH<sub>2</sub>O. Die Deckgläser wurden mit Gel Mount auf dem Objektträger fixiert und

anschließend über Nacht bei Raumtemperatur dunkel gelagert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger im Kühlschrank gelagert, bis diese mithilfe des konfokalen Laser Scanning Mikroskops analysiert wurden. Mit dem Computerprogramm Zen black edition wurden die Mikroskopbilder dargestellt und bearbeitet.

#### **II.2.4 Statistische Auswertung und Bearbeitung**

Während der experimentellen Arbeit wurden die Experimente mindestens viermal unabhängig voneinander durchgeführt. Ausnahme stellen folgende Experimente dar:

- Cycloheximid-Experiment (zweimal wiederholt )
- Cycloheximid und Bafilomycin A Doppelbehandlung-Experiment (einmal durchgeführt )

Um die statistische Analyse durchzuführen, wurden die Banden des Westernblots auf einem Röntgenfilm entwickelt und mithilfe eines Scanners digitalisiert. Anschließend wurden die Daten anhand der Quantity-One Software densitometrisch quantifiziert und mit GAPDH normalisiert. Die graphische Darstellung und die statistische Auswertung wurden anhand des Computerprogramms GraphPad Prism 5 erstellt. Dabei wurde für die Auswertung mit one-way- und two-way-Varianzanalysen sowie den Bonferroni-Vergleichstest gearbeitet. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung sind als Balken dargestellt. Statistische Werte mit  $p < 0,05$  wurden als signifikant, Werte mit  $p < 0,01$  als hoch signifikant und Werte mit  $p < 0,001$  als sehr hoch signifikant bezeichnet. Aufgenommene Bilder (für die Immunfluoreszenzfärbung) mit den konfokalen Laserscanning Mikroskop, wurden exportiert und mit der ZEN Software analysiert.

Mithilfe der CoreIDRAW X7 Software wurden die Abbildungen bearbeitet.

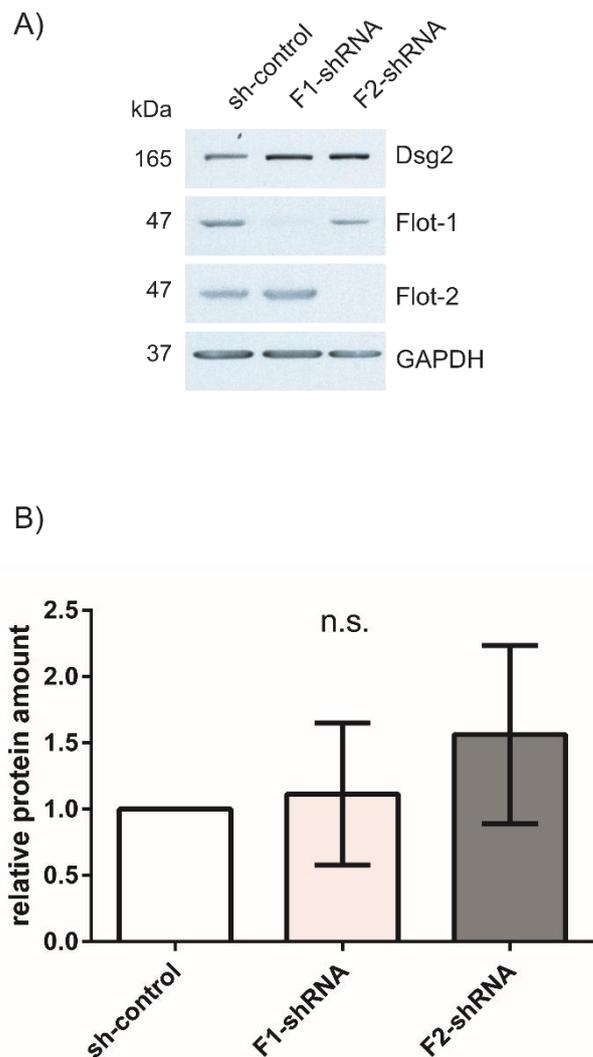
### **III Ergebnisse**

Im Folgenden werden die experimentellen Ergebnisse dieser Studie dargestellt, die sich mit desmosomalen Zelladhäsionsproteinen in Flotillin-Knockdown HaCaT-Zellen beschäftigen. Insbesondere liegt der Fokus zum einen auf die Morphologische Veränderung der Plasmamembran und zum anderen auf den Expressionslevel der Proteine in Flotillin-Knockdown Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen.

#### **III.1 Einfluss von Flot-1- und Flot-2-Knockdown auf die Expression von Desmoglein-2 in HaCaT-Keratinocyten**

Um den Expressionslevel von Dsg2 in HaCaT-Zellen darzustellen, wurden die gewonnenen Proteinlysate in einem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Durch spezifische Antikörper wurden die Proteine detektiert. Abbildung 8 zeigt den Expressionslevel von Dsg2 in stabilen Flot-1- und Flot-2-Knockdown HaCaT-Zellen und in Kontrollzellen. Flot-1 und- 2 wurden detektiert, um den Knockdown in den jeweiligen Proben zu überprüfen. Zudem dient GAPDH als Ladekontrolle und wurde bei der Quantifizierung mitberechnet.

Aus Abbildung 8A wird ersichtlich, dass der Dsg2-Proteinlevel in den HaCaT-Knockdown Proben tendenziell höher war im Vergleich zu dem Proteinlevel in HaCaT-Kontrollzellen. Weiterhin wurden die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten durch die densitometrische Quantifizierung (Abbildung 8B) weiter ausgewertet. Die statistische Auswertung zeigte, dass die Erhöhung des Proteinlevels in den HaCaT-Knockdown Zellen keinen signifikanten Unterschied darstellt (Abbildung 8B). Daraus kann man schließen, dass Flotilline keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Dsg2 haben.

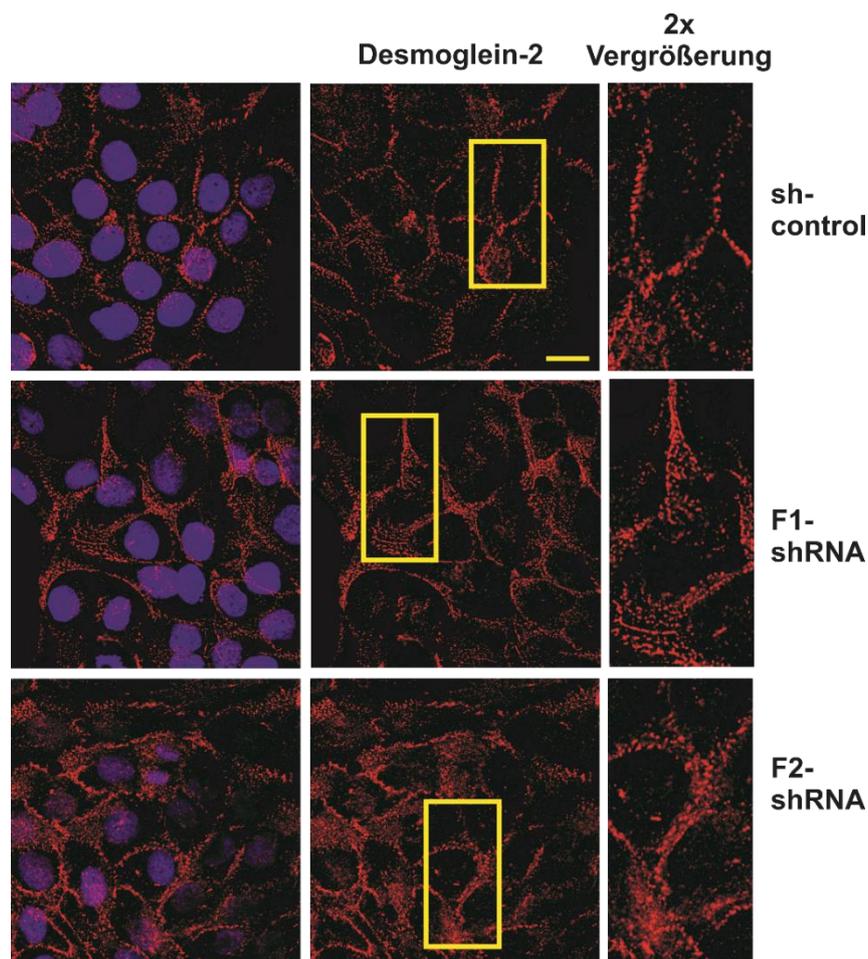


**Abbildung 8: Flot-1 und Flot-2 Knockdown in HaCaT-Keratinocyten hat keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Desmoglein-2**

(A) Dsg2 Expressionslevel in stabilen Flot-1-(F1-shRNA) und Flot-2-(F2-shRNA) Knockdown-HaCaT-Zellen sowie -Kontrollzellen (shControl) mittels Western Blot. (B) Quantifizierung des Dsg2-Proteinlevels. Die Signale wurden auf GAPDH normalisiert und um den Hintergrundwert korrigiert. Die Balken stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten ( $n = 4$ ) dar. Es wurde ein one-way ANOVA mit Bonferroni's multiple comparison Test durchgeführt, um die Signifikanz der Ergebnisse zu überprüfen.

### III.2 Einfluss von Flot-1- und Flot-2-Knockdown auf die Lokalisation und Morphologie des Dsg2-Proteins in HaCaT-Keratinozyten

Da durch das vorangegangene Experiment festgestellt wurde, dass Flotilline keinen signifikanten Einfluss auf den Dsg2-Expressionslevel haben, wurde die Morphologie und Lokalisation von Dsg2 in HaCaT-Flot-1- und -Flot-2 –Knockdown-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen mittels konfokaler Laser Scanning-Mikroskopie untersucht. Dafür wurden die Zellen auf Deckgläschen in einer 12-Well-Platte bei 37°C kultiviert. Nachdem die Zellen konfluent wuchsen, wurden diese mit MeOH fixiert. Anschließend wurde mit Dsg2 mittels Immunfluoreszenz gefärbt.



**Abbildung 9: Knockdown von Flotillinen in HaCaT-Zellen resultiert in einer veränderten Lokalisation und Morphologie von Dsg2 an der Plasmamembran**

HaCaT-Kontroll- (shControl), Flot-1-Knockdown- (F1-shRNA) und Flot-2-Knockdown-(F2-shRNA) Zellen wurden zwei Tage auf Deckgläschen in einer 12-Well-Platte kultiviert. Anschließend wurden mit MeOH fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-Dsg2 (rot) Antikörper und einem dsDNA spezifischen Fluoreszenzfarbstoff für die Zellkerne (DAPI, blau) durchgeführt. Um die Morphologie und Lokalisation von Dsg2 besser beurteilen zu können, wurde ein vergrößerter Bereich der Plasmamembran dargestellt. Maßstab= 20µm.

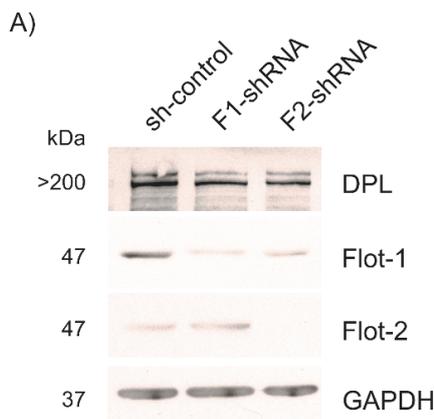
Das Ergebnis der Dsg2-Immunfluoreszenzfärbung ist in Abbildung 9 dargestellt. Hier wurde Dsg2 rot und die Zellkerne blau mit DAPI, einem dsDNA spezifischen Fluoreszenzfarbstoff, gefärbt.

Da Dsg2 sich hauptsächlich an der Plasmamembran befindet, ist diese rot gefärbt. In der ersten Spalte, in der beide Färbungen überlagert sind, sind die Plasmamembran (rot) und der Zellkern (blau) in den drei Zelllinien zu sehen. Eine zweifache Vergrößerung (rechts) wurde erstellt, damit die Morphologie besser beurteilt werden kann.

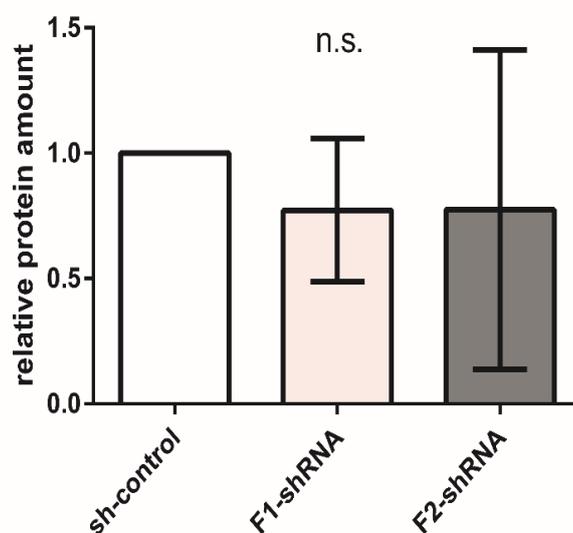
In den HaCaT-Kontrollzellen (sh-control) ist Dsg2 konzentriert und dicht an der Plasmamembran lokalisiert. Vergleicht man nun die Kontrollzellen mit den HaCaT-Knockdown-Zellen so sieht man, dass Dsg2 in den Flotillin-Knockdown-Zellen diffus und anders verteilt um die Plasmamembran lokalisiert ist. Daraus kann man folgern, dass das Fehlen von Flotillin einen Einfluss auf die Lokalisation und Morphologie des Zelladhäsionsproteins Dsg2 hat. Es führt zu einer zerstreuten Lokalisation an der Plasmamembran und damit möglicherweise zu einer schwächeren desmosomalen Adhäsion der Zellen untereinander.

### **III.3 Auswirkung von Flot-1- und Flot-2-Knockdown auf den Desmoplakin Expressionslevel in HaCaT Keratinozyten**

DP ist ein weiterer Bestandteil der desmosomalen Zelladhäsionsproteine. Es befindet sich im Gegensatz zu Dsg2 vollständig im Zytoplasma der Zellen und stellt die Verbindung zwischen IF und weiteren desmosomalen Zelladhäsionsproteinen dar (Bornslaeger et al. 1996). Um den Einfluss von Flotillinen auf desmosomalen Strukturen weiter zu untersuchen, wurde DP in Flotillin-Knockdown und HaCaT-Kontrollzellen untersucht. Dafür wurden die Zellen in 6-Well-Platten kultiviert. Im Anschluss wurden die Proteinlysate gewonnen und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem spezifischen anti-DP-Antikörper. In Abbildung 10A ist der DP-Expressionslevel in Flot-1- und Flot-2-Knockdown sowie in Kontrollzellen zu sehen. Die Signalintensität für den Expressionslevel in den Kontrollzellen ist etwas stärker als in den HaCaT-Knockdown-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass in Abwesenheit von Flotillinen der DP-Proteinlevel vermindert sein könnte.



B)



**Abbildung 10: Kein signifikanter Einfluss von Flot-1- und Flot-2 -Knockdown auf die Expression von DP**

(A) Darstellung des DP-Expressionslevels in HaCaT-Kontroll-(sh-control), Flot-1-Knockdown-(F1-shRNA) und Flot-2-Knockdown-(F2-shRNA) Zellen mittels Western Blot. (B) Densitometrische Quantifizierung und Darstellung von DP-Proteinlevel in HaCaT-Kontroll-(sh-control), Flot-1-Knockdown-(F1-shRNA) und Flot-2-Knockdown-(F2-shRNA) Zellen. Die Signale wurden auf GAPDH normalisiert und um den Hintergrundwert korrigiert. Die Balken stellen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der vier unabhängigen Experimente dar ( $n=4$ ). Es wurde ein one-way ANOVA mit Bonferroni's multiple comparison-Test durchgeführt, um die Signifikanz der Ergebnisse zu überprüfen. n. s. = nicht signifikant

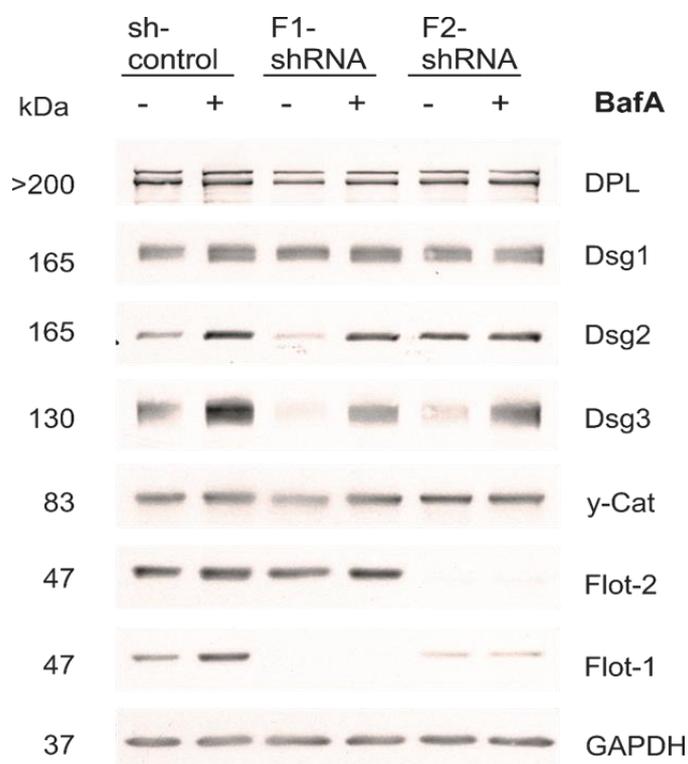
Die densitometrische Quantifizierung der DP-Signale aus vier unabhängigen Experimenten (Abbildung 10B) und die statistische Auswertung ergeben allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen dem DP-Proteinlevel in Flot-1- und Flot-2-Knockdown sowie HaCaT-Kontrollzellen. Durch die fehlende Signifikanz kann man hier vermuten, dass Flotilline keinen großen Einfluss auf den Expressionslevel von DP haben. Allerdings

ist durch die großen Schwankungen der DP-Proteinmenge in den Flot-2-Knockdown Zellen bzw. durch den daraus resultierenden hohen Fehlerbalken keine endgültige Aussage möglich. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von DP in Flotillin-Knockdown HaCaT-Zellen verändert ist (Völlner et al. 2016) und vermutlich ein Zusammenhang besteht.

### **III.4 Inhibierung des lysosomalen Abbaus führt zu Akkumulation von Dsg3 und Dsg2 in HaCaT-Keratinocyten**

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, auf welchem Wege Flotilline den Expressionslevel desmosomaler Zelladhäsionsproteine beeinflussen. Eine entscheidende Frage ist dabei, ob Flotilline den Aufbau- oder Abbau-Weg desmosomaler Zelladhäsionsproteine beeinflussen. Um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen, wurden Flot-1- und Flot-2- Knockdown- sowie HaCaT-Kontrollzellen für zwei bis drei Tage in einer 6-Well-Platte bei 37°C kultiviert. Nachdem die Zellen konfluent wuchsen, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die zu behandelnden Zellen erhielten für 24 Stunden einen Zusatz von 50 nM Bafilomycin A (BafA). Die unbehandelten Zellen bekamen einen Mediumwechsel ohne Zusatz. Nach 24-stündiger Inkubation mit Bafilomycin A wurden Proteinlysate gewonnen und mittels SDS-Gel und Western Blot analysiert. In Abbildung 11 sind die behandelten (+) und unbehandelten (-) Flot-1- und Flot-2-Knockdown- und HaCaT-Kontrollzellen mit den jeweiligen desmosomalen Zelladhäsionsproteinen aufgeführt. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet und bei der densitometrischen Quantifizierung (Abbildung 11) zur Normalisierung verwendet. Flot-1- und Flot-2- Proteine wurden detektiert um den Knockdown in den jeweiligen Proben zu überprüfen. Das Expressionslevel von DP, Dsg1 und Plakoglobin ( $\gamma$ -Catenin) in den behandelten und unbehandelten Zellen sowie im Vergleich zwischen den unbehandelten Flotillin-Knockdown- und -Kontrollzellen ist nicht verändert (siehe Abbildung 11). Wie bereits bekannt (Völlner et al. 2016), ist der Proteingehalt von Dsg3 in den unbehandelten Kontrollzellen höher als in den unbehandelten Flotillin-Knockdown Zellen. Zudem scheint der Dsg2 Proteinlevel in den unbehandelten Flot-1-Knockdown-Zellen verringert zu sein im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll- und Flot-2-Knockdown-Zellen. Man beachte, dass hier insgesamt sechs unabhängige Experimente durchgeführt worden sind -und nur in zwei Experimenten verhält sich der Dsg2-Proteinlevel auf diese Weise. In den weiteren Experimenten schwankte der Dsg2-Expressionslevel in den unbehandelten HaCaT-Zellen.

Weiterhin auffallend ist, dass das verminderte Dsg3-Expressionslevel durch die Behandlung mit BafA wieder erhöht wird. Das Dsg2-Expressionslevel verhält sich ähnlich, indem er nach BafA-Behandlung ansteigt. Alle weiteren Expressionslevel der desmosomalen Zelladhäsionsproteine zeigen keine Veränderung nach BafA-Behandlung.

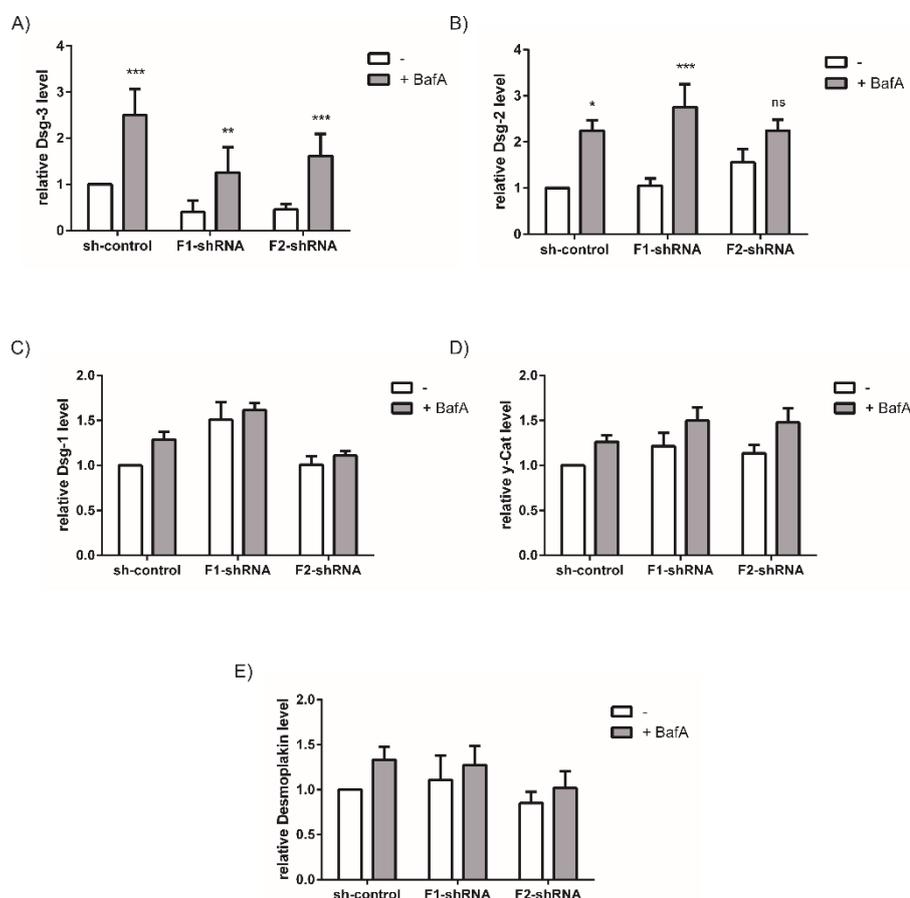


**Abbildung 11: In Flotillin-Knockdown-Zellen führt die Inhibierung des lysosomalen Abbaus zu Akkumulierung von Dsg3 und Dsg2 in HaCaT Zellen**

Dsg3, Dsg2, Dsg1, PG(y-Cat) und DPL-Expressionslevel in HaCaT-Flot-1 Knockdown-(F1-shRNA), in Flot-2 Knockdown-(F2-shRNA) und HaCaT-Kontrollzellen (shControl). Nach einer 48-stündigen Inkubation der Zellen in einer 6-Well-Platte unter Wachstumsbedingungen erfolgte ein Mediumwechsel mit Zusatz von 50 nM Bafilomycin A (+) in den zu behandelnden Zellen. Der Mediumwechsel bei den unbehandelten Zellen (-) wurde mit dem üblichen Medium ohne Zusatz durchgeführt. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Proteinlysate gewonnen, mit Western Blot analysiert und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Es wurden sechs unabhängige Experimente durchgeführt (n = 6).

BafA ist ein spezifischer Inhibitor der Vakuolaren-Typ H<sup>+</sup>-ATPase in Lysosomen, der die Ansäuerung im Vesikel hemmt und gleichzeitig die Funktion des Lysosoms beeinträchtigt. Somit kann man schlussfolgern, dass Dsg3 und Dsg2 lysosomal abgebaut werden. Durch die Hemmung des lysosomalen Abbauwegs akkumulieren Dsg2 und 3 in der

Zelle und es kommt zu einem erhöhten Proteinlevel. Die densitometrische Quantifizierung und die statistische Analyse (siehe Abbildung 12) ergaben signifikante Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten HaCaT-Zellen für Dsg2 und Dsg3.



**Abbildung 12: Inhibierung des lysosomalen Abbaus führt in HaCaT-Zellen zu Akkumulierung von Dsg-3 und Dsg-2**

Densitometrische Quantifizierung der Dsg3 (A), Dsg2 (B), Dsg1 (C), PG( $\gamma$ -Cat) (D) und DP (E) Proteinlevel in HaCaT-Flot-1-Knockdown-(F1-shRNA), in Flot-2-Knockdown-(F2-shRNA) und HaCaT-Kontrollzellen (sh-control). Nach einer 48-stündigen Inkubation der Zellen in einer 6-Well-Platte unter Wachstumsbedingungen erfolgte ein Mediumwechsel mit Zusatz von 50 nM Bafilomycin A (+; grauer Balken) in den zu behandelnden Zellen. Der Mediumwechsel bei den unbehandelten Zellen (-; weißer Balken) wurde mit dem üblichen Medium ohne Zusatz durchgeführt. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurden die Proteinlysate gewonnen, mit Western Blot analysiert und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Signale wurden mit GAPDH normalisiert und um den Hintergrundwert korrigiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  der Standardabweichung.  $n = 6$

Der Proteinlevel von Dsg3 (Abbildung 12A) ergab bei allen drei Zellgruppen-, Flot-1-knockdown, Flot-2-Knockdown sowie in Kontrollzellen-, einen signifikanten Unterschied zwischen den mit BafA behandelten und den unbehandelten Proben. Weiterhin ergab der Proteinlevel von Dsg2 (Abbildung 12B) in Kontrollzellen und Flot-1-Knock-

down, einen signifikanten Unterschied zwischen den mit BafA behandelten und den un- behandelten HaCaT Zellen. Zudem ist der Proteinlevel von Dsg1, DP und PG ( $\gamma$ -Catenin) in den behandelten und unbehandelten Zellen gleichmäßig geblieben; die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten und un- behandelten Proben dieser Proteine.

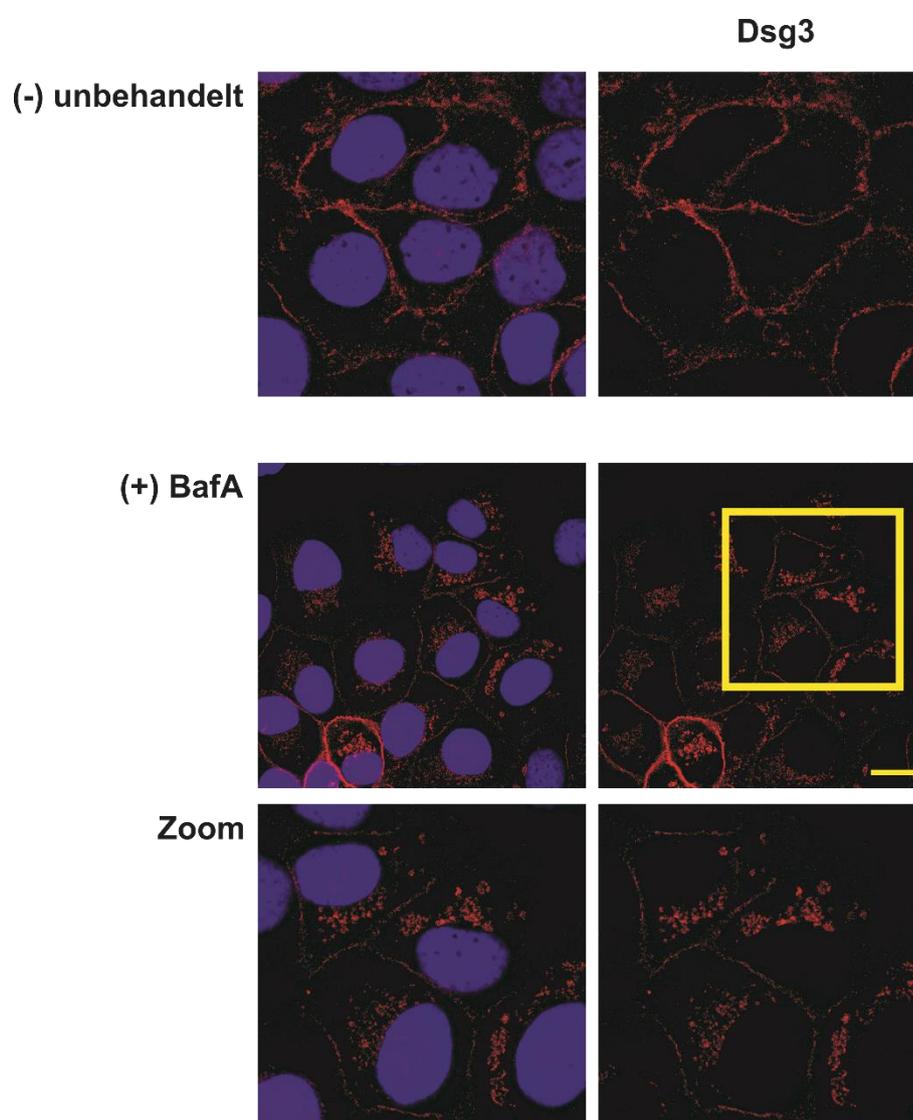
Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass Flotilline einen differenzierten Einfluss auf den Proteinlevel desmosomaler Zelladhäsionsproteine haben. So ist der Proteinlevel von Dsg3 in den unbehandelten Flotillin-Knockdown-Zellen signifikant vermindert im Ver- gleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Bei allen weiteren desmosomalen Zelladhä- sionsproteinen bleibt der Proteinlevel in den unbehandelten Flotillin-Knockdown-Zellen relativ stabil und ist nicht im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant verändert. Somit wird mit dem Proteinlevel desmosomaler Zelladhäsionsproteine verdeutlicht (Abbildung 12), wie unterschiedlich stark der Flotillin-knockdown einen Einfluss auf den Expressi- onslevel der Proteine nimmt. Durch die Inhibierung des lysosomalen Abbauwegs und die Akkumulierung von Dsg3 und Dsg2 wird deutlich, dass beide Proteine lysosomal abge- baut werden. DP, Dsg1 und PG ( $\gamma$ -Catenin) scheinen nicht oder weniger lysosomal abge- baut zu werden, da der Proteinlevel dieser Proteine sich nach Bafilomycin A-Behandlung nicht ändert. DP und PG sind zytosolische Proteine und können sich somit den lysosoma- len Abbauweg entziehen. Dahingegen ist Dsg1 ein Transmembranärer Protein und a.e. aufgrund der verminderten Dynamik stabiler an der Plasmamembran haften bleibt als Dsg2 und Dsg3. Somit ist der Effekt bei Dsg1 nach Bafilomycin A-Behandlung nicht so stark zu sehen.

### **III.5 Nach Inhibierung des lysosomalen Abbaus in HaCaT-Keratinozy- ten akkumuliert Dsg3 in Lysosomen**

Wie in den vorherigen Ergebnissen ersichtlich wurde, kommt es durch die Hemmung des lysosomalen Abbaus zu einer Akkumulation von Dsg3 und teilweise Dsg2 in HaCaT- Zellen. Die Auswirkung der Hemmung auf die Lokalisation der Proteine in der Zelle sollte genauer untersucht werden. Daher wurde zunächst eine Dsg3-Immunfluoreszenz- färbung durchgeführt. Dazu wurden HaCaT-Kontrollzellen, Flot-1- und Flot-2-Knock- down-Zellen auf Deckgläschen in einer 12-Well-Platte kultiviert. Nachdem die Zellen konfluent wuchsen, wurden die zu behandelnden Zellen 24 Stunden mit 50 nM BafA behandelt. Die unbehandelten Zellen bekamen einen Mediumwechsel ohne Zusatz von

weiteren Stoffen. Anschließend wurden die Zellen mit MeOH fixiert und die Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischem anti-Dsg3 (rot) Primär- und Sekundär-Antikörper durchgeführt. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI gefärbt.

Abbildung 13 stellt die Dsg3-Immunfluoreszenz-Färbung in HaCaT-Kontrollzellen (sh-control) dar. Hier sind die unbehandelten und die behandelten Zellen sowie eine Vergrößerung der behandelten Zellen zu sehen. Schaut man sich nun erstmals die unbehandelten Zellen an, so erkennt man, dass Dsg3 hauptsächlich in der Plasmamembran lokalisiert ist. Behandelt man die Zellen allerdings mit BafA, so sieht man vesikuläre klumpige Strukturen, die ebenfalls rot gefärbt sind, im Zytoplasma der Kontrollzellen. Diese Strukturen sind Dsg3 Proteine, die sich nach BafA-Behandlung und somit Hemmung des lysosomalen Abbaus in zytoplasmatischen vesikulären Strukturen der Zelle akkumulieren.

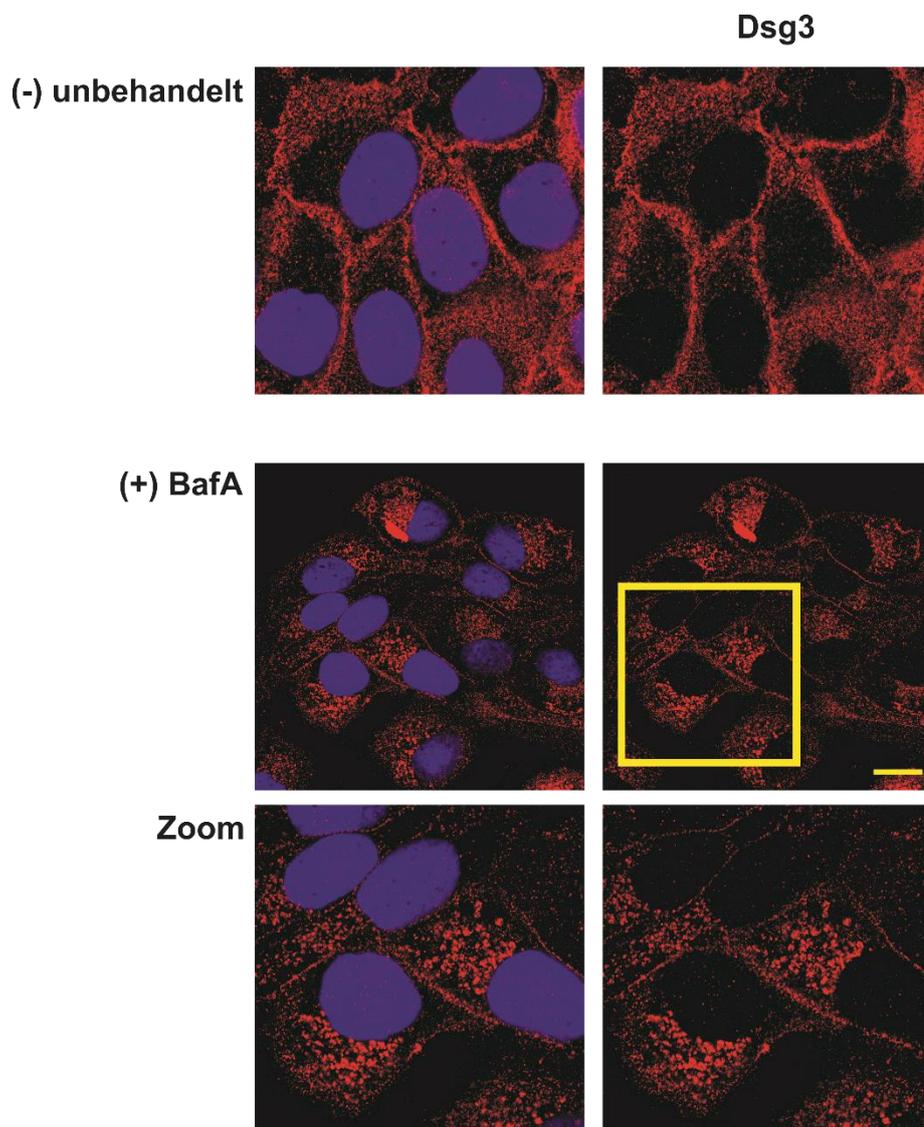


**Abbildung 13: Akkumulation von Dsg3 in shControl HaCaT-Zellen nach Bafilomycin A-Behandlung**

Immunfluoreszenzfärbung von Dsg3 in HaCaT-Kontrollzellen (sh-control).

Nach einer 48-stündigen Inkubation der HaCaT-Zellen auf Deckgläschen in einer 12-Well-Platte erfolgte ein Mediumwechsel mit Zusatz von 50 nM Bafilomycin A (+ BafA) in den zu behandelnden Zellen. Der Mediumwechsel bei den unbehandelten Zellen (-) wurde mit dem üblichen Medium ohne Zusatz durchgeführt. Nach anschließender 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit MeOH fixiert und mit Antikörpern gegen Dsg3 (rot; Dsg3) gefärbt. Die Markierung der Zellkerne (blau) erfolgte mit DAPI. Maßstab= 20µm.

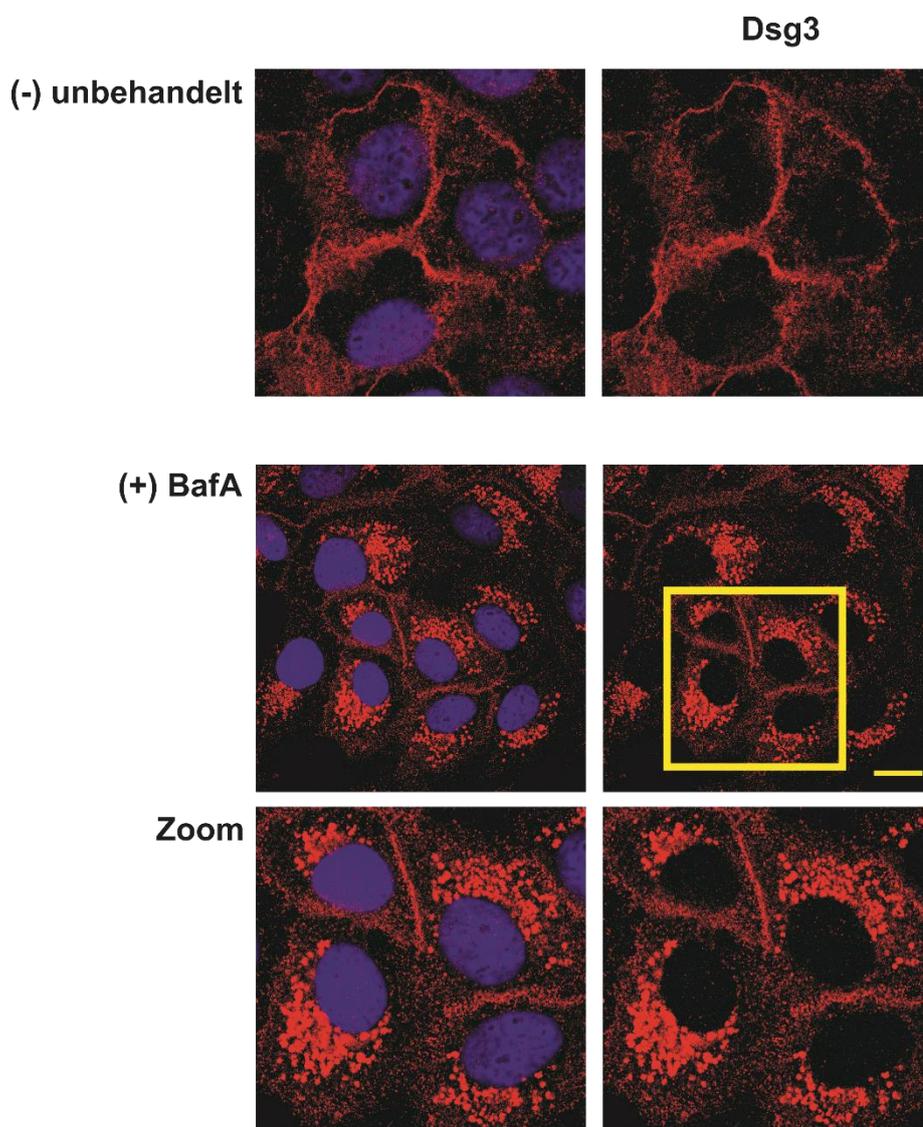
In Abbildung 14 ist die Dsg3-Immunfluoreszenzeinzelfärbung in Flot-1 Knockdown-Zellen dargestellt. Im Vergleich zu der vorherigen Abbildung 13 fällt hier bei den unbehandelten Flot-1-Knockdown-Zellen die Plasmamembran auf, die durch die lockere und etwas verstreute Lokalisation von Dsg3 zustande gekommen ist. Die Lokalisation und Anordnung der Proteine ist etwas aufgelockert, sodass die Plasmamembran nicht mehr dicht und straff erscheint wie bei den Kontrollzellen.



**Abbildung 14: Akkumulation von Dsg3 in Flot-1-Knockdown-HaCaT-Zellen nach Bafilomycin A-Behandlung**

Immunfluoreszenzfärbung von Dsg3 in Flotillin-1-Knockdown- (F1-shRNA) HaCaT -Zellen. Nach einer 48-stündigen Inkubation der HaCaT-Zellen auf Deckgläschen in einer 12-Well-Platte erfolgte ein Mediumwechsel mit Zusatz von 50 nM Bafilomycin A (+ BafA) in den zu behandelnden Zellen. Der Mediumwechsel bei den unbehandelten Zellen (-) wurde mit dem üblichen Medium ohne Zusatz durchgeführt. Nach anschließender 24-stündiger Inkubation, wurden die Zellen mit MeOH fixiert und mit Antikörpern gegen Dsg3 (rot) gefärbt. Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. Maßstab = 20  $\mu$ m.

Im Gegensatz dazu sieht man in den BafA-behandelten Flot-1-Knockdown-Zellen vermehrt rot gefärbte vesikuläre und klumpige Strukturen im Zytoplasma. Diese sind Dsg3-Proteine, die in zytoplasmatischen vesikulären Strukturen der Zelle akkumulieren, nachdem der lysosomale Abbauweg durch BafA gehemmt wurde, ähnlich wie bei den behandelten HaCaT-Kontrollzellen.



**Abbildung 15: Akkumulation von Dsg3 in Flot-2-Knockdown-HaCaT-Zellen nach BafA-Behandlung**

Immunfluoreszenzfärbung von Dsg3 in Flotillin-2-Knockdown- (F2-shRNA) Zellen. Nach einer 48-stündigen Inkubation der HaCaT-Zellen auf Deckgläschen in einer 12-Well-Platte erfolgte ein Mediumwechsel mit Zusatz von 50 nM Bafilomycin A (+ BafA) in den zu behandelnden Zellen. Der Mediumwechsel bei den unbehandelten Zellen (-) wurde mit dem üblichen Medium ohne Zusatz durchgeführt. Nach anschließender 24-stündiger Inkubation, wurden die Zellen mit MeOH fixiert und mit Antikörpern gegen Dsg3 (rot) gefärbt. Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. Maßstab = 20  $\mu$ m.

Die Lokalisation der Dsg3-Proteine an der Plasmamembran hat sich daher vermindert und deshalb sieht diese nun etwas verblasst aus im Gegensatz zu den unbehandelten HaCaT-Kontrollzellen (Abbildung 13).

Abbildung 15 zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung der Flot-2-Knockdown Zellen. Hier ist in den unbehandelten Flot-2-Knockdown-Zellen die Plasmamembran etwas diffuser

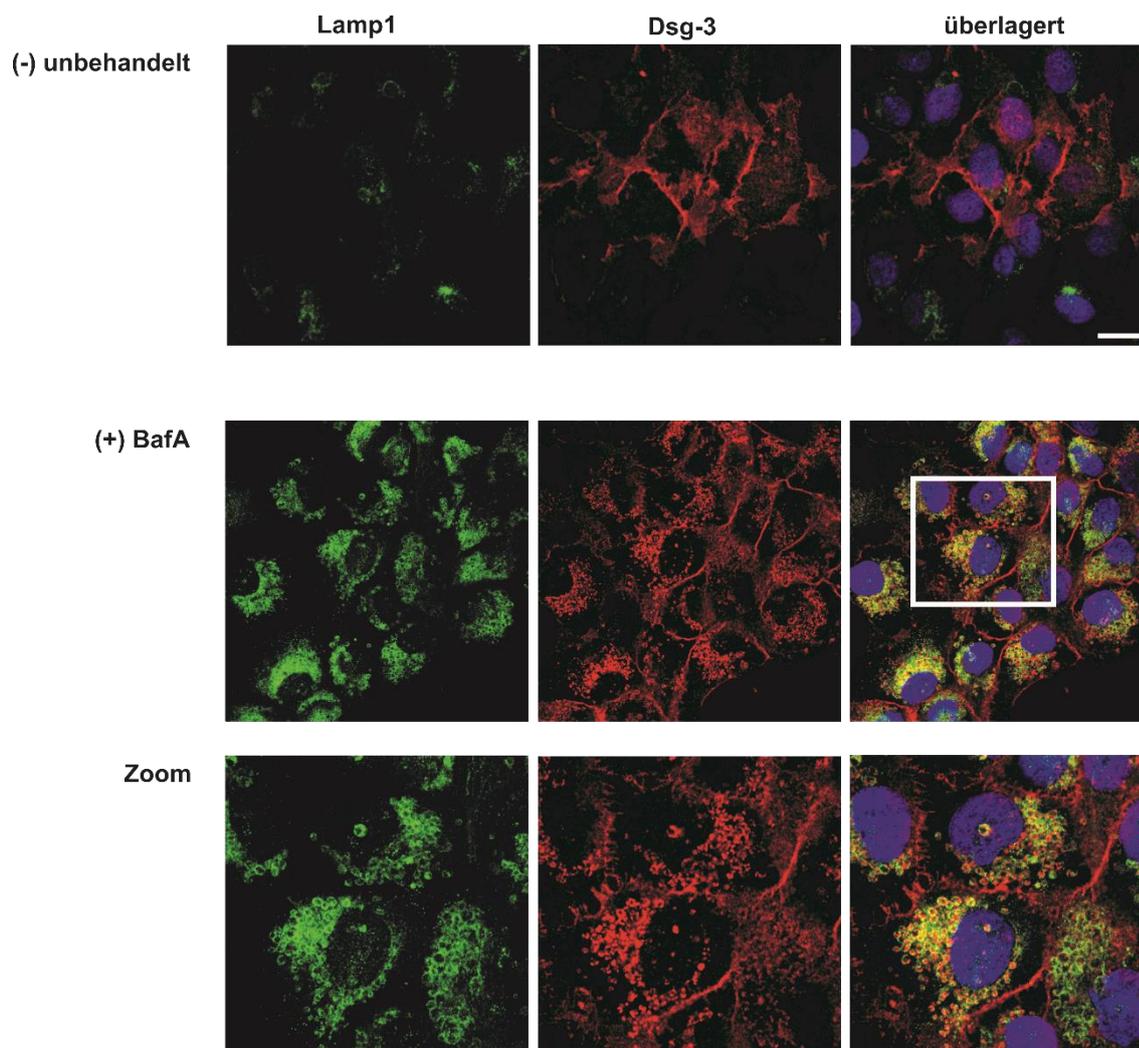
dargestellt als es bei den Flot-1-Knockdown- oder den Kontrollzellen der Fall ist. Die Lokalisation von Dsg3 ist nicht dicht und straff an der Plasmamembran zu sehen, sondern eher aufgelockert- ähnlich wie bei Flot-1-Knockdown Zellen (siehe Abbildung 14). In den BafA behandelten Flot-2-Knockdown-Zellen häufen sich wiederum rot gefärbte vesikuläre Strukturen, die Dsg3 darstellen, im Zytoplasma an. Aufgrund der Lokalisation zwischen Zellkern und Plasmamembran kann man sagen, dass Dsg3-Proteine sich in zytoplasmatischen vesikulären Strukturen befinden.

Weiterhin beobachtet man durch die Akkumulation von Dsg3 in intrazellulären Kompartimenten der Flotillin-Knockdown-Zellen eine Veränderung der Dsg3-Lokalisation und Morphologie an der Plasmamembran. Schaut man sich in Abbildung 14 und Abbildung 15 die unbehandelten Knockdown-Zellen an und dann die mit BafA behandelten Zellen, erkennt man eine etwas dichtere und konzentrierte Anordnung der Dsg3 Proteine an der Plasmamembran als in den unbehandelten Flot-1- und -2- Knockdown-Zellen. Darüber hinaus fällt auf, dass in den Knockdown-Zellen tendenziell mehr Dsg3 in zytoplasmatischen vesikulären Strukturen akkumuliert als in den Kontrollzellen. Dies weist darauf hin, dass in den Knockdown Zellen vermehrt Dsg3 abgebaut wird.

Im Anschluss an die Einzelfärbung wurde eine Doppelfärbung durchgeführt um zu sehen, ob sich die Proteine nach BafA-Behandlung tatsächlich in den durch BafA geschädigten Lysosomen anlagern. Dazu wurden die Zellen ebenfalls auf Deckgläschen in einer 12-Well-Platte für zwei Tage kultiviert. Nachdem die Zellen konfluent wuchsen, wurden diese mit 50 nM BafA behandelt. Die unbehandelten Zellen erhielten einen Mediumwechsel ohne Zusatz. Anschließend wurde die Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischem anti-Dsg3 (rot) und anti-Lamp1 (grün) Antikörpern durchgeführt.

Lamp1, ein Lysosomen-assoziiertes Glykoprotein, dient als spezifischer Marker für Lysosomen. Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI markiert. In Abbildung 16 ist die Immunfluoreszenz Doppelfärbung der HaCaT-Kontrollzellen (sh-control) zu sehen.

In der ersten Spalte zeigt Abbildung 16 grüne Strukturen (Lamp1:grün), in der zweiten Spalte rot gefärbte Strukturen (Dsg3: rot) und in der letzten Spalte sind beide Färbungen zusammen dargestellt und ergeben bei Überlagerung die Farbe gelb.

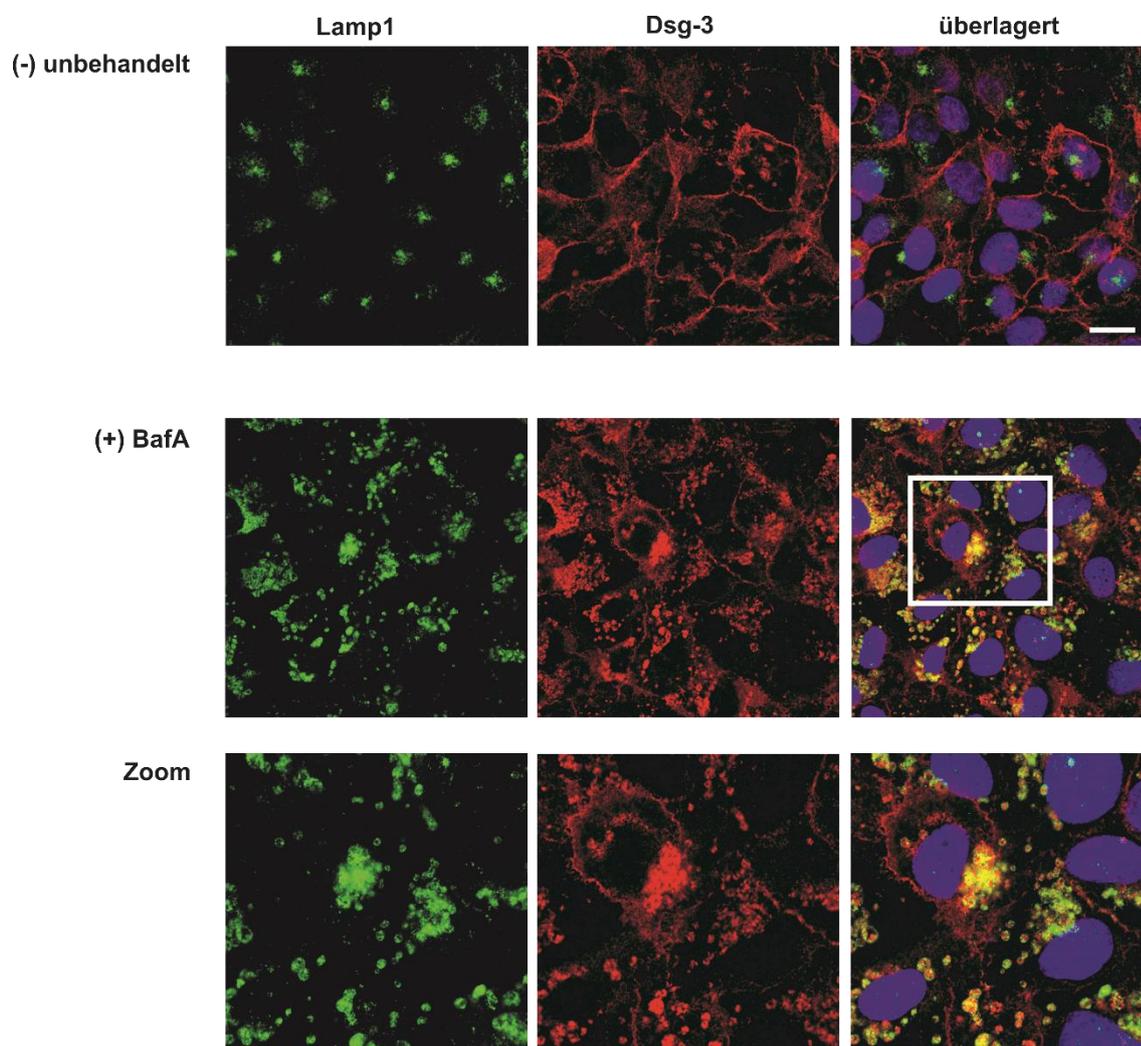


**Abbildung 16: Kolokalisation von Dsg3 und Lamp1 in sh-control HaCaT-Zellen nach BafA-Behandlung**

Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Lamp1 und Dsg3 in sh-control HaCaT-Zellen. Nach einer 48-stündigen Inkubation der HaCaT-Zellen auf Deckgläschen in einer 12-Well-Platte, erfolgte ein Mediumwechsel mit Zusatz von 50 nM Baf A (+ BafA) in den zu behandelnden Zellen. Der Mediumwechsel bei den unbehandelten Zellen (-) wurde mit dem üblichen Medium ohne Zusatz durchgeführt. Nach anschließender 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit MeOH fixiert und mit anti-Dsg3 (rot) und anti-Lamp1 (grün)-Antikörpern mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Die Markierung der Zellkerne (blau) erfolgte mit DAPI. Maßstab = 20  $\mu$ m.

Man unterscheidet in Abbildung 16 behandelte von unbehandelten HaCaT Kontrollzellen. Da Dsg3 sich konzentriert und vermehrt in der Plasmamembran befindet, ist die Plasmamembran in der Abbildung rot dargestellt. Die grünen Strukturen stellen die Lysosomen dar und sind daher im Zytoplasma der Zelle lokalisiert. In den unbehandelten Kontrollzellen erscheinen die genannten Strukturen vermindert und verbläst und nicht intensiv im Vergleich zu den behandelten Kontrollzellen. Weiterhin fällt auf, dass nach BafA-

Behandlung rot gefärbte vesikuläre und klumpige Strukturen, die Dsg3-Proteine darstellen, sich in zytoplasmatischen vesikulären Strukturen der Zelle befinden. Nach BafA-Behandlung vermehren sich ebenfalls die Lysosomen im Zytoplasma. Schaut man nun die überlagerte Darstellung der Doppelfärbung an, so sieht man, dass sich nach BafA-Behandlung die Lysosomen und Dsg3-Strukturen intrazellulär überlagern (gelb). Daraus lässt sich folgern, dass Dsg3 wie angenommen wurde, lysosomal abgebaut wird. Durch

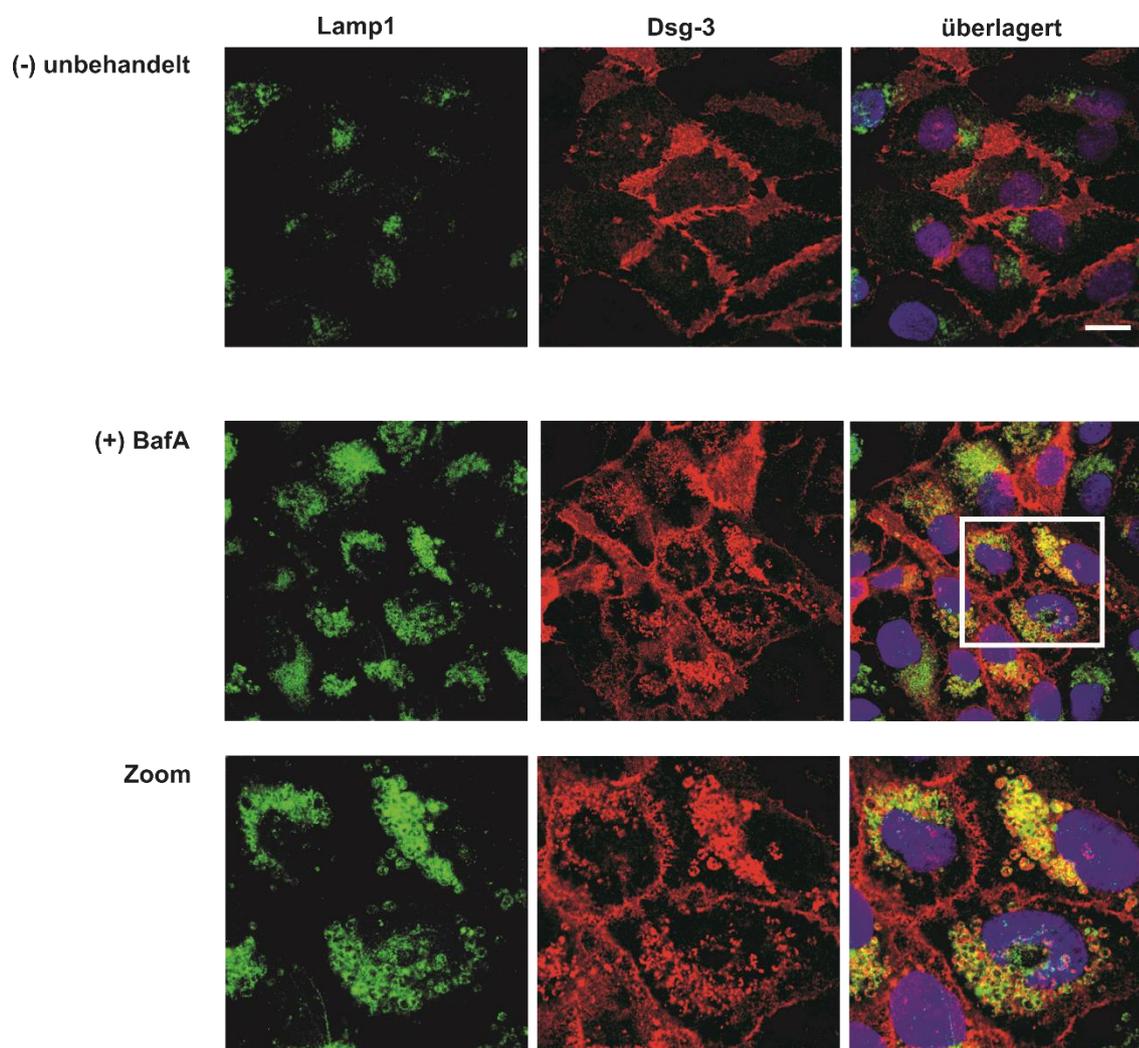


**Abbildung 17: Kolokalisation von Dsg3 und Lamp1 in Flot-1-Knockdown-HaCaT-Zellen nach BafA-Behandlung**

Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Lamp1 und Dsg3 in Flotillin-1-Knockdown-HaCaT-Zellen. Nach einer 48-stündigen Inkubation der HaCaT-Zellen auf Deckgläschen in einer 12-Well-Platte erfolgte ein Mediumwechsel mit Zusatz von 50 nM Baf A (+ BafA) in den zu behandelnden Zellen. Der Mediumwechsel bei den unbehandelten Zellen (-) wurde mit dem üblichen Medium ohne Zusatz durchgeführt. Nach anschließender 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit MeOH fixiert und mit anti-Dsg3 (rot) und anti-Lamp1 (grün)-Antikörpern mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Die Markierung der Zellkerne (blau) erfolgte mit DAPI. Maßstab = 20µm.

die lysosomale Hemmung akkumuliert es in den Lysosomen, die sich in zytoplasmatischen vesikulären Strukturen der Zelle befinden.

Weiterhin wurde die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung ebenfalls mit Flot-1-Knockdown- (siehe Abbildung 17) und Flot-2-Knockdown- (siehe Abbildung 18) HaCaT-Zellen durchgeführt. Beide Zellgruppen ergaben eine Kolokalisation von Dsg3 und Lamp1 nach BafA-Behandlung.



**Abbildung 18: Kolokalisation von Dsg3 und Lamp1 in Flotillin-2-Knockdown-HaCaT-Zellen nach Bafilomycon A-Behandlung**

Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Lamp1 und Dsg3 in Flot-2-Knockdown-HaCaT Zellen. Nach einer 48-stündigen Inkubation der HaCaT-Zellen in einer 12-Well-Platte erfolgte ein Mediumwechsel mit Zusatz von 50 nM BafA (+ BafA) in den zu behandelnden Zellen. Der Mediumwechsel bei den unbehandelten Zellen (-) wurde mit dem üblichen Medium ohne Zusatz durchgeführt. Nach anschließender 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit MeOH fixiert und mit anti-Dsg-3 (rot) und anti-Lamp1 (grün) Antikörpern mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Die Markierung der Zellkerne (blau) erfolgte mit DAPI. Maßstab = 20µm.

Anzumerken ist hier, dass bei allen drei unbehandelten Zellgruppen sich die Plasmamembran (Dsg3-Lokalisation) und die Intensität der Lysosomen unterscheiden. In den unbehandelten HaCaT-Kontrollzellen ist die Lamp1-Färbung schwächer als in den unbehandelten Flot-1- und Flot-2- Knockdown-HaCaT-Zellen. In der Studie von Meister et al. wurde schon gezeigt, dass Flotilline bei dem endosomalen Transport eine Rolle spielen und ihr Fehlen Defekte in Endosomen und Lysosomen verursachen kann (Meister und Tikkanen 2014).

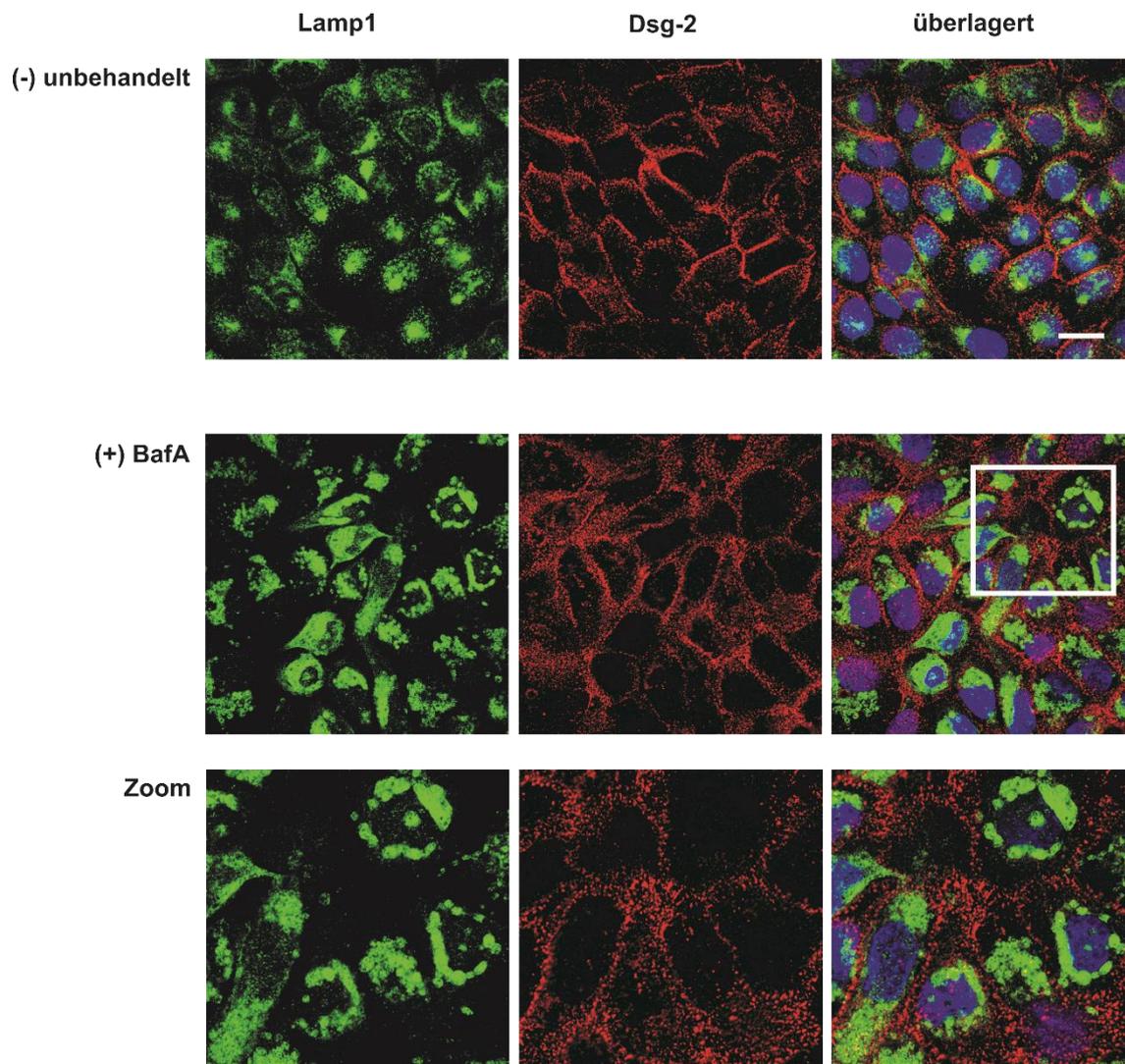
### **III.6 Immunfluoreszenz Doppelfärbung von Dsg2 und Lamp1 nach Bafilomycin A Behandlung in HaCaT-Keratinocyten**

In den vorherigen Abbildungen wurde die Kolokalisation von Dsg3-Proteinen und den Lysosomen nach BafA-Behandlung bewiesen. Nun stellte sich die Frage, ob das Dsg2-Protein lysosomal abgebaut wird und wie sich die Lokalisation nach BafA-Behandlung ändert. Dazu wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Dsg2 und Lamp1 in Flot-1- und- Flot-2-Knockdown- sowie HaCaT-Kontrollzellen durchgeführt (siehe Abbildungen 19-21). Hierfür wurde ähnlich wie bei der Dsg3 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung Dsg2 rot markiert und Lamp1 grün.

Vergleicht man zuerst die unbehandelten Flot-1- und Flot-2- Knockdown- mit den unbehandelten Kontrollzellen, so sieht man eine konzentrierte und dichte Lokalisation von Dsg2 an der Plasmamembran in den unbehandelten Kontrollzellen. Dadurch erscheint die Plasmamembran dicht und stabil. Im Gegensatz dazu ist die Plasmamembran in den unbehandelten Flot-1- und- 2-Knockdown-Zellen etwas aufgelockert, da Dsg2-Proteine sich nicht konzentriert und dicht an der Plasmamembran befinden. Der Flotillin Knockdown hat also einen Einfluss auf die Morphologie von Dsg2 an der Plasmamembran.

Darüber hinaus wurde nach BafA-Behandlung in den Kontrollzellen keine so starke Akkumulation von Dsg2 im Zytoplasma beobachtet, wie es bei Dsg3 der Fall war (vgl. Abbildung 16, mit Abbildungen 11 und 12). In den Flot-1- und Flot-2-Knockdown-Zellen ist Dsg2 nicht streng an der Plasmamembran lokalisiert, sondern aufgelockert um die Plasmamembran herum und im Zytoplasma. Zu beobachten ist, dass nach Bafilomycin A-Behandlung in Flot-1-Knockdown-Zellen sich Dsg2 zu vesikulären und klumpigen Strukturen im Zytoplasma versammelt (Abbildung 20). Die überlagerten Doppelfärbungen zeigen allerdings keinerlei sichtbare Kolokalisation von Dsg2 und Lamp1 nach Hem-

mung des lysosomalen Abbauwegs, d. h. Dsg2 befindet sich nicht oder kaum in Lysosomen, anders als Dsg3. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Dsg2 in Flot-1- und Flot-2-Knockdown-Zellen nicht so sehr stark beeinträchtigt ist wie Dsg3 und es daher nicht zur sichtbaren Akkumulation und Kolokalisation mit lysosomalen Strukturen kommt. Allerdings zeigen die Abbildungen in denen die Lokalisation und Morphologie von Dsg2 an der Plasmamembran in Flot-1- und Flot-2-Knockdown-Zellen in einem gewissen Maße beeinträchtigt sind, dass Flotilline Dsg2 beeinflussen können.

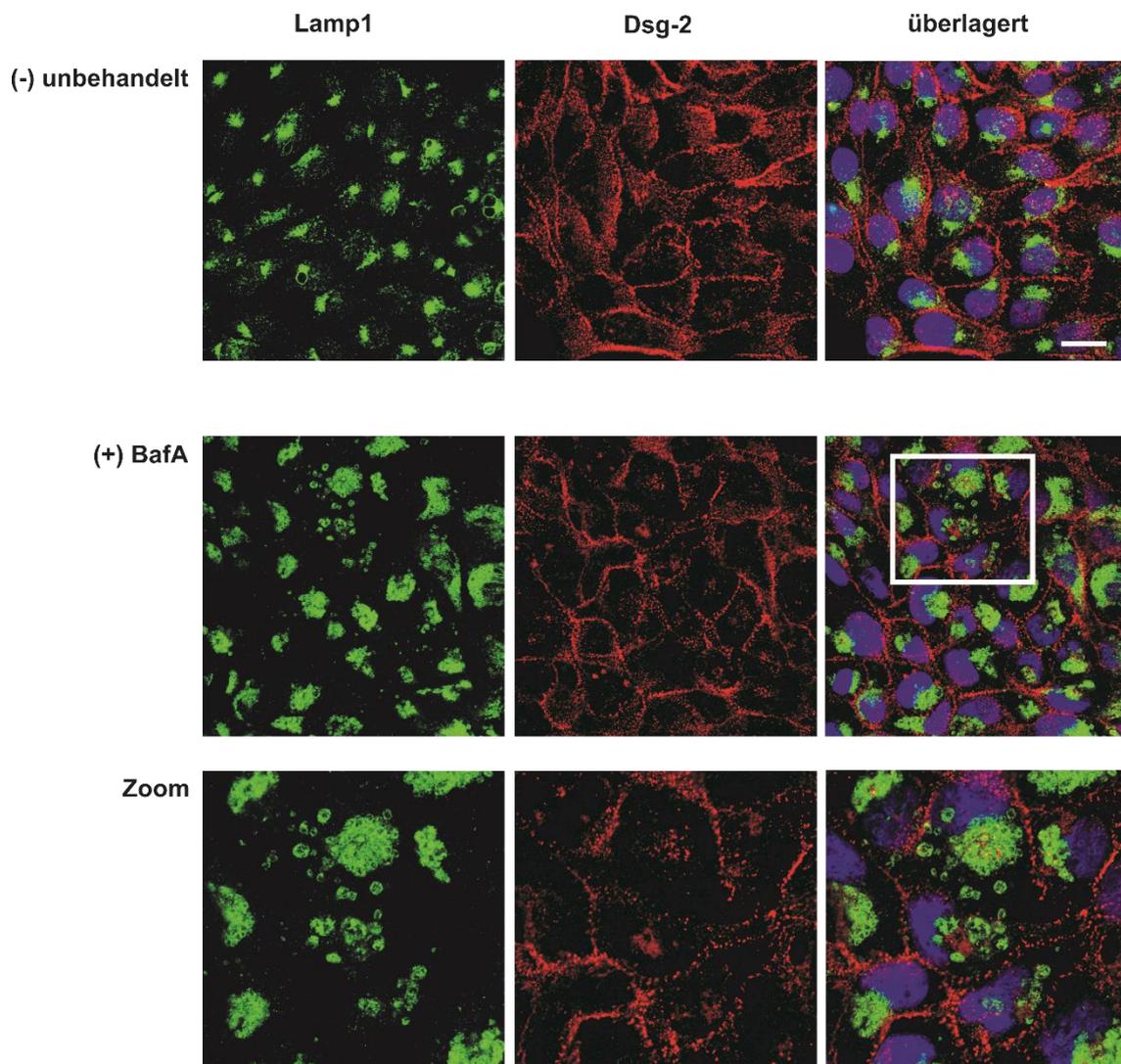


**Abbildung 19: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Dsg2 und Lamp1 nach BafA-Behandlung zeigt keine Kolokalisation in sh-control HaCaT-Zellen**

Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Lamp1 und Dsg2 in sh-control HaCaT-Zellen. Nach einer 48-stündigen Inkubation der HaCaT Zellen auf Deckgläschen in einer 12-Well-Platte erfolgte ein Mediumwechsel mit Zusatz von 50 nM BafA (+ BafA) in den zu behandelnden Zellen. Der Mediumwechsel bei den unbehandelten Zellen (-) wurde mit dem üblichen Medium ohne Zusatz durchgeführt. Nach anschließender 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit MeOH fixiert und mit anti-Dsg2 (rot) und anti-Lamp1 (grün)-

Antikörpern mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Die Markierung der Zellkerne (blau) erfolgte mit DAPI. Maßstab = 20µm.

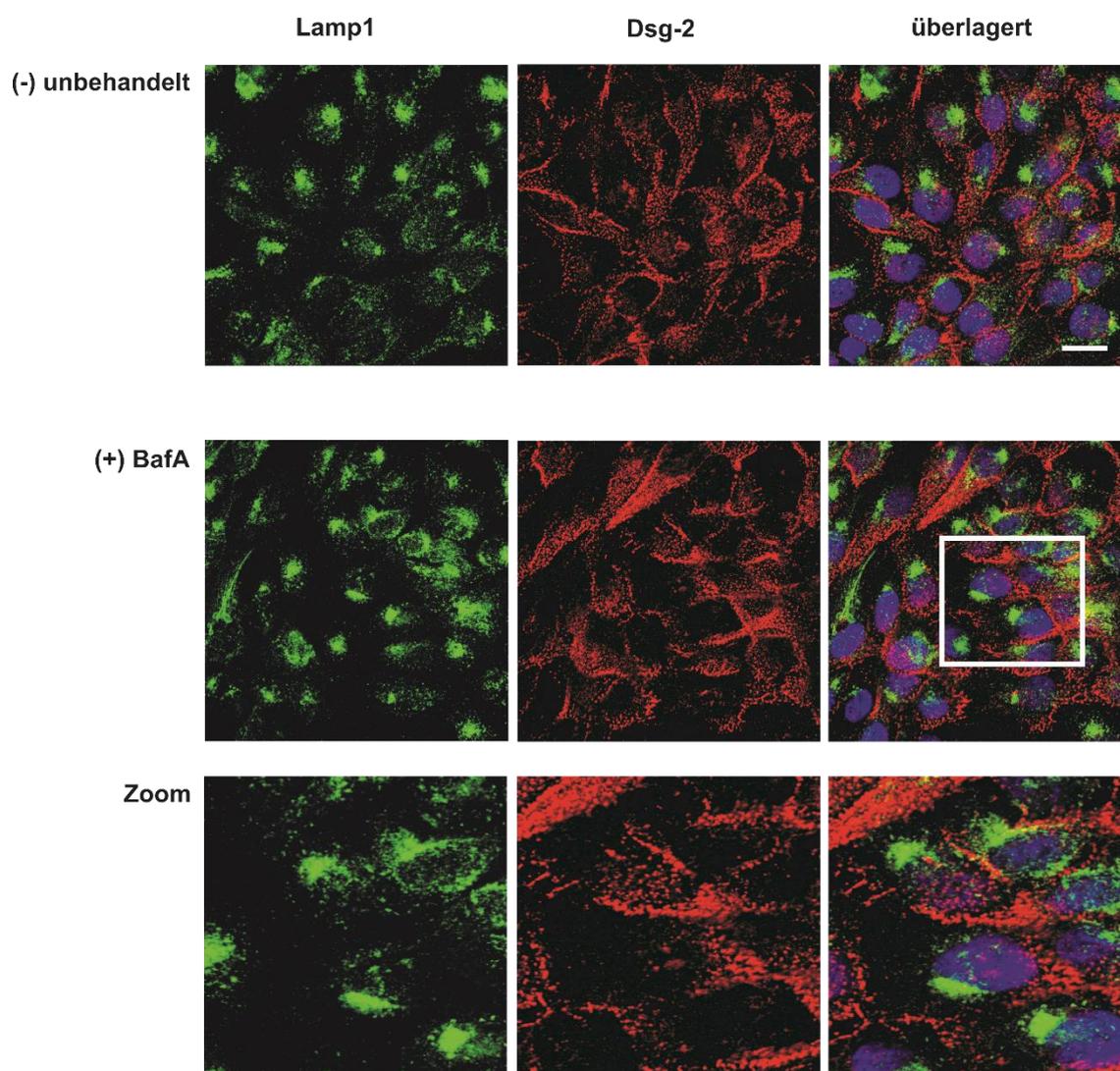
Vergleicht man in Abbildung 19 die behandelten und unbehandelten HaCaT-Kontrollzellen, so sieht man auf der einen Seite wie sich die Struktur der Plasmamembran ändert und auf der anderen Seite, wie sich die Lysosomen vermehren und zu vesikulären klumpigen Strukturen werden. Durch BafA wird der lysosomale Abbauweg gehemmt und dadurch akkumulieren jegliche Proteine, die lysosomal abgebaut werden, in den Lysosomen. Diese zeigen sich in der Abbildung 19 als grün gefärbte vesikuläre Strukturen. Hier ist keine Kolo-kalisation von Dsg2 mit Lamp1 zu beobachten.



**Abbildung 20: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Dsg2 und Lamp1 nach BafA-Behandlung zeigt keine Kolo-kalisation in Flot-1-Knock-down-HaCaT-Zellen**

Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Lamp1 und Dsg2 in Flotillin-1-Knockdown-HaCaT-Zellen. Nach einer 48-stündigen Inkubation der HaCaT-Zellen auf Deckgläschen in einer 12-Well-Platte erfolgte ein Mediumwechsel mit Zusatz von 50 nM BafA (+ BafA) in den zu behandelnden Zellen. Der Mediumwechsel bei den unbehandelten Zellen (-) wurde mit dem üblichen Medium ohne Zusatz durchgeführt. Nach anschließender 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit MeOH fixiert und mit anti-Dsg2 (rot) und anti-Lamp1 (grün) -Antikörpern mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Die Markierung der Zellkerne (blau) erfolgte mit DAPI. Maßstab = 20µm.

In Abbildung 20 sind unbehandelte und mit BafA behandelte Flot-1-Knockdown-Zellen zu sehen, die mit Lamp1 und Dsg2 Immunfluoreszenz markiert worden sind. Nach der Behandlung mit BafA verhalten sich die Flot-1- Knockdown-Zellen ähnlich wie bei den Kontrollzellen. Die Plasmamembran ändert sich und die Lysosomen werden zu vesikulären und klumpigen Strukturen. Da man hier minimale Verfärbungen der klumpigen Strukturen mit Dsg2 erkennen kann, ist hier eine geringe Kolokalisation in betracht zu ziehen.



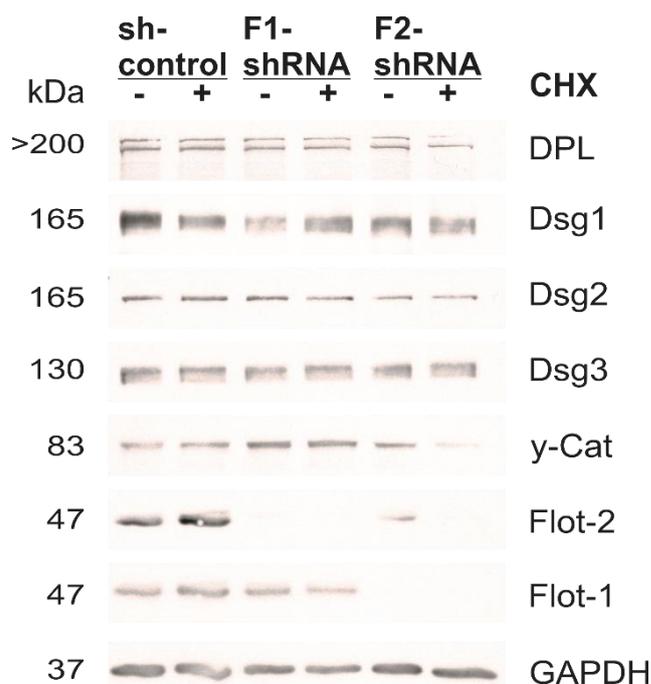
**Abbildung 21: Immunfluoreszenz- Doppelfärbung von Dsg2 und Lamp1 nach Bafilomycin A-Behandlung zeigt keine Kolokalisation in Flotillin-2-Knockdown-HaCaT-Zellen**

Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Lamp1 und Dsg2 in Flot-2-Knockdown-HaCaT-Zellen. Nach einer 48-stündigen Inkubation der HaCaT-Zellen in einer 12-Well-Platte erfolgte ein Mediumwechsel mit Zusatz von 50 nM BafA (+BafA) in den zu behandelnden Zellen. Der Mediumwechsel bei den unbehandelten Zellen (-) wurde mit dem üblichen Medium ohne Zusatz durchgeführt. Nach anschließender 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit MeOH fixiert und mit anti-Dsg2 (rot) und anti-Lamp1 (grün)-Antikörpern mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Die Markierung der Zellkerne (blau) erfolgte mit DAPI. Maßstab = 20µm.

Bei Flot-2 Knockdown-HaCaT-Zellen unterscheiden sich die unbehandelten und die mit BafA behandelten HaCaT-Zellen in Abbildung 21 geringfügig voneinander. Man erkennt eine vermehrte Verstreuung der Dsg2 Proteine in zytoplasmatischen vesikulären Strukturen der behandelten Zellen und eine Vermehrung der Lysosomen. Eine Kolokalisation ist zwar nicht eindeutig feststellbar aber auch nicht auszuschließen, da man minimale gelbliche Verfärbungen der klumpigen Strukturen im Zytoplasma erkennen kann.

### **III.7 Expressionslevel von desmosomalen Zelladhäsionsproteinen nach Behandlung mit Cycloheximid in HaCaT-Keratinocyten**

Mit BafA wurde der Abbauweg gehemmt, um zu untersuchen ob Flotilline in HaCaT-Keratinocyten den Abbau regulieren. Um einen möglichen Einfluss von Flotillinen auf die Proteinexpression zu untersuchen wurde die Neusynthese von Adhäsionsproteinen in HaCaT-Zellen gehemmt. Dafür setzt man Cycloheximid ein- ein Antibiotikum das von Streptomyceten produziert wird und bei Eukaryoten die Proteinbiosynthese hemmt. Ähnlich wie bei Bafilomycin A wurden die HaCaT-Zellen für 24 Stunden mit Cycloheximid behandelt und anschließend die Proteinlysate gewonnen und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern der aufgeführten desmosomalen Zelladhäsionsproteine. Anzumerken ist hier, dass die Konzentration der gewonnenen Proteinlysate sehr niedrig war und dadurch die weiteren Untersuchungen erschwert waren. In der Abbildung 22 ist zu beobachten, dass der Proteinlevel der aufgeführten Proteine unter Einfluss von Cycloheximid sich kaum ändert. Dieses Experiment wurde zweimal wiederholt, und man kam zu dem Schluss, dass der Expressionslevel der untersuchten Proteine nicht durch Cycloheximid beeinflusst wird.



**Abbildung 22: Nach einer Behandlung mit dem Translationshemmer Cycloheximid zeigten sich keine signifikanten Veränderungen im Expressionslevel der aufgeführten Zelladhäsionsproteine**

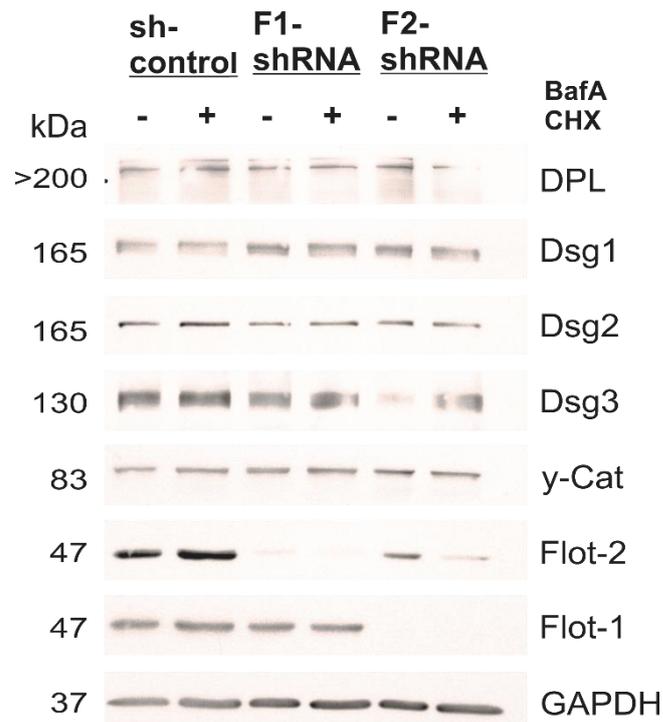
Protein-Expressionslevel von Dsg3, Dsg2, Dsg1, PG(y-Cat) und DP (DPL) in Flot-1-Knockdown-(F1-shRNA), in Flot-2-Knockdown-(F2-shRNA) und HaCaT-Kontrollzellen (sh-control). Nach einer 48-stündigen Inkubation der Zellen bei 37°C in einer 6-Well-Platte erfolgte ein Mediumwechsel mit Zusatz von 10 µg/ml Cycloheximid (+CHX) in den zu behandelnden Zellen. Der Mediumwechsel der unbehandelten Zellen wurde mit dem üblichen Medium ohne Zusatz behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Proteinlysate gewonnen und mit Western Blot analysiert. Die Detektion der aufgeführten Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Flot-1 und Flot-2 wurden detektiert, um den Knockdown zu überprüfen. Zudem wurde GAPDH detektiert und als Ladekontrolle verwendet.

### **III.8 Expressionslevel von Zelladhäsionsproteinen nach doppelter Behandlung mit Cycloheximid und Bafilomycin A in HaCaT-Keratinocyten**

Abschließend wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem beide Substanzen verwendet wurden - BafA und Cycloheximid (Abbildung 23). Die Idee dahinter war sicherzustellen, dass während der Hemmung des Abbauwegs keine weiteren desmosomalen Proteine synthetisiert werden. Gleichzeitig wurde das Expressionslevel der vorhandenen desmosomalen Proteine in Flotillin-Knockdown und -Kontrollzellen beobachtet.

Die Doppelbehandlung wirkte sich toxisch auf die Zellen aus, so dass es extrem schwierig war, genügend Proteinlysate zu gewinnen. Aus diesem Grund wurde der Versuch nur

einmal durchgeführt. Ein Einfluss auf den Expressionslevel konnte hierbei nicht festgestellt werden.



**Abbildung 23: Doppelbehandlung mit BafA und CHX in HaCaT-Zellen ergab keine signifikante Veränderung im Proteinlevel der aufgeführten Zelladhäsionsproteine**

Protein-Expressionslevel von Dsg3, Dsg2, Dsg1, PG(y-Cat) und DP (DPL) in Flot-1-Knockdown-(F1-shRNA), in Flot-2-Knockdown-(F2-shRNA) und HaCaT-Kontrollzellen (sh-control). Nach einer 48-stündigen Inkubation der Zellen bei 37°C in einer 6-Well-Platte erfolgte ein Mediumwechsel mit Zusatz von 10 µg/ml Cycloheximid (+ CHX) und 50 nM BafA in den zu behandelnden Zellen. Der Mediumwechsel der unbehandelten Zellen (-) wurde mit dem üblichen Medium ohne Zusatz behandelt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Proteinlysate gewonnen und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion der aufgeführten Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Flot-1 und Flot-2 wurden detektiert, um den Knockdown zu überprüfen. Zudem wurde GAPDH detektiert und als Ladekontrolle verwendet.

## IV Diskussion

In dieser Studie wurde der Zusammenhang zwischen Flotillinen, die mit Membranmikrodomänen assoziiert sind, und Desmosomen dargestellt. Auf der einen Seite zeigt sich, dass Flotilline in bestimmten Zelltypen bestimmte desmosomale Proteine mehr beeinflussen als andere. So z. B. ist der Proteinlevel und Morphologie sowie die Lokalisation von Dsg3 in HaCaT-Keratinocyten durch das Fehlen von Flotillinen stark beeinträchtigt, im Gegensatz zu Dsg1, 2, PG und DPL (siehe Abbildung 8 bis 12). Auf der anderen Seite wird anhand von Immunfluoreszenz-Färbungen festgestellt, dass Flotilline desmosomale Proteine an der Plasmamembran stabilisieren und deren Lokalisation und Morphologie beeinflussen (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14). Beim Fehlen von Flotillin-1 und Flotillin-2 werden desmosomale Proteine wie Dsg3 vermehrt abgebaut (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15). Im Allgemeinen deuten die Daten dieser Studie daraufhin, dass Flotilline die Endozytose bestimmter desmosomaler Cadherine (Dsg3) beeinflussen, indem sie den Abbauweg regulieren. Inwieweit Flotilline eine Rolle in der Endozytose darstellen und auf welcher molekularen Ebene es basiert, wurde in dieser Arbeit analysiert.

Verschiedene Studien belegen die Assoziation von Desmosomen mit Membranmikrodomänen (Brennan et al. 2012; Resnik et al. 2011; Stahley et al. 2014). Die Kolo-kalisation von in Membranmikrodomänen vorkommenden Proteinen mit klassischen Cadherinen ist seit längerem bekannt (Guillaume et al. 2013; Kurrle et al. 2013b; Solis et al. 2012; Rötzer et al. 2015). Zwischen Flotillinen und PG ( $\gamma$ -Cat) (Kurrle et al. 2013b), Dsg3 bzw. den Isoformen von Desmocollinen besteht eine direkte Verbindung. Dabei fungiert die ICS-Sequenz der desmosomalen Cadherine vermutlich als Bindestelle (Völlner 2016).

Welchen Effekt die Bindung an Flotillinen auf die desmosomalen Proteine hat, wurde bislang nicht vollständig aufgeklärt. Neben den fest in den Desmosomen verankerten und mit dem Zytoskelett assoziierten desmosomalen Cadherinen (desmosomaler Pool) liegen desmosomale Cadherine auch außerhalb der Desmosomen an der Plasmamembran vor (extradesmosomaler Pool) (Windoffer et al. 2002). Zwischen den beiden Pools findet ein ständiger Austausch statt, der es den Desmosomen ermöglicht, einerseits dynamisch und flexibel zu bleiben und andererseits ihre Aufgabe im Rahmen der Zelladhäsion zu erfüllen. Da Flotilline einen eigenen Mikrodomänenbereich darstellen, stellt sich die Frage, ob Flotilline die Mikrodomänen-Assoziation von desmosomalen Cadherinen und die Dynamik zwischen den Desmosomen gebundenen und den nicht Desmosomen gebundenen

Pool beeinflussen. Diese Fragestellung untersuchten Völlner et al. (2016) mithilfe der sequentiellen Detergenz-Extraktion an HaCaT-Kontrollzellen und Flot-1- und -2-Knockdown-Zellen. Mit dem Experiment kann man die Verteilung der desmosomalen Komponenten in den beiden Pools analysieren. Durch eine Extraktion mit einem Triton X-100-haltigen Puffer wurden die Proteine des extradesmosomalen Pools abgetrennt. Anschließend wurden die mit dem Zytoskelett verbundenen Proteine des desmosomalen Pools mit einem SDS- und Harnstoff-haltigen Puffer gelöst. Die Proteinzusammensetzung beider Pools wurde durch Western-Blots analysiert, wobei keine Veränderungen der Verteilung desmosomaler Cadherine in Flotillin-depletierten HaCaT-Zellen auftraten. Diese Befunde belegen, dass Flotilline die Verteilung desmosomaler Cadherine zwischen beiden Pools nicht beeinflussen. Zudem zeigten Dichtegradienten-Experimente von Dsg3, Dsg1 und PG keine signifikante Veränderung der Assoziation der desmosomalen Cadherine an Membrane-Rafts (Völlner et al. 2016). In den HaCaT-Kontrollzellen und in den Flot-1- und -2-Knockdown-Zellen befand sich der größte Anteil von Dsg3 im desmosomalen Pool und der größte Anteil von Dsg1 im extradesmosomalen Pool an der Plasmamembran (Völlner et al. 2016). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass Dsg3 den Hauptbestandteil von Desmosomen in HaCaT-Keratinocyten darstellt. Störungen in der Dsg3 Funktion führen zu der schwerwiegenden Hauterkrankung Pemphigus vulgaris (Delva et al. 2008). Die Desmosomen enthalten in verschiedenen Gewebe unterschiedliche desmosomale Cadherine (Schäfer et al. 1996). Störungen in der Dsg2-Synthese verursachen daher keine Hauterkrankung, sondern manifestieren sich im Herzmuskelgewebe als *ARVC* (Awad et al. 2006) und im Darm in Form einer gestörten Barrierefunktion (Schlegel et al. 2010). In der vorliegenden Studie unterschieden sich die Proteinniveaus von Dsg2 in den Flotillin-depletierten HaCaT-Zellen nicht signifikant von den Niveaus in den HaCaT-Kontrollzellen, im Gegensatz zu den Niveaus von Dsg3 (Völlner et al. 2016). Für diesen Befund gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen befinden sich die Zellen je nach Konfluenz in einem anderen Stadium und dadurch ist möglicherweise die Variation aufgrund der unterschiedlichen Konfluenz der Zellen in den vier Versuchsreihen zu groß gewesen. Zum anderen ist bekannt, dass Dsg2 kein Hauptbestandteil von Desmosomen in Keratinocyten ist. Aufgrund des gewebespezifischen Expressionsmusters von Dsg2, wäre eine Wiederholung der Experimente in Herzmuskelzellen oder Darmzellen sinnvoll (Schäfer et al. 1996; Ungewiß et al. 2017; Kessler et al. 2019).

In den Immunfluoreszenzfärbungen von Dsg2 in den Flotillin-depletierten HaCaT-Keratinocyten fiel eine Fehllokalisierung von Dsg2 auf. Anders als in den HaCaT-Kontrollzellen, in denen das Dsg2 mehrheitlich an der Plasmamembran gebunden vorlag, war die Verteilung in diesen Zellen deutlich weniger geordnet an der Plasmamembran lokalisiert als in den Kontrollzellen. Somit deuten diese Ergebnisse doch darauf hin, dass Flotilline die Lokalisation von Dsg2 beeinflussen.

Weiterhin ist die Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse zum Effekt von Flotillinen auf das DP-Niveau in Flotillin-Knockdown-HaCaT-Zellen aufgrund der Variation in den vier Experimentreihen gering. Eine mögliche Erklärung für die Variation ist die unterschiedliche Konfluenz der Zellen in den Experimenten, ähnlich wie bei Dsg2. Immunfluoreszenzfärbungen zeigten aber, dass DP ähnlich wie Dsg2 und Dsg3 eine veränderte Morphologie und Lokalisation in Flotillin-Knockdown-HaCaT-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen aufweist (Völlner et al. 2016). Diese Ergebnisse stimmen mit weiteren Studien überein, die in diesen Zellen eine veränderte Lokalisation von E-Cadherin und  $\gamma$ -Cat an der Plasmamembran beobachteten (Guillaume et al. 2013; Kurrle et al. 2013b; Solis et al. 2012). Insgesamt deutet die aktuelle Datenlage daraufhin, dass Flotilline an der Regulation und Stabilisation von Zelladhäsionsproteinen an der Plasmamembran beteiligt sind.

Der gesteigerte Abbau von desmosomalen Cadherinen und die veränderte Morphologie sowie Fehllokalisierung in Flotillin-depletierten HaCaT-Zellen in der vorliegenden Studie spricht für eine Schwächung der Zelladhäsion. Um diese These zu überprüfen, setzten Völlner et al. (2016) Flotillin-depletierte HaCaT-Keratinocyten und Kontrollzellen in einem Dispase-basierten Dissoziationstest (DBDA) ein, bei dem mit Dispase II behandelte konfluente Zellmonolayer mechanischen Scherkräften ausgesetzt wurden. Dabei kam es in den Flot-1- und -2-Knockdown-HaCaT-Keratinocyten zu einer Fragmentierung der Zellmonolayer, während bei den Kontrollzellen die Zellmonolayer nahezu intakt blieben. Weiter führten die Wissenschaftler einen Aggregationstest durch, bei dem die Fähigkeit einzelner Zellen Aggregate zu bilden gemessen wird. Der Aggregationstest ergab überraschenderweise eine um den Faktor 5 erhöhte Aggregationskapazität bei den Flotillin-depletierten HaCaT-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die auf den ersten Blick widersprüchlichen Befunde erklären die Autoren damit, dass der DBDA-Assay spezifisch die durch Desmosomen vermittelte Adhäsivität misst, während das Ergebnis des Aggregationstests auch von anderen Adhäsionsverbindungen (z.B. durch klassische Cadherine)

abhängt. Eine durch den Flotillin-Knockdown gestörte desmosomale Adhäsion führt zu einer verstärkten Reaggregation der Zellen untereinander, wahrscheinlich bedingt durch übersteigerte Adhärensverbindungen (Völlner et al. 2016).

Die Beeinträchtigung der Zelladhäsionsmoleküle in den Flotillin-depletierten Zellen scheint die Membranverteilung und Assoziation nicht zu beeinflussen (Völlner et al. 2016). Daher besteht die Möglichkeit, dass Flotilline durch andere Mechanismen desmosomale Cadherine beeinflussen. Da Flotilline bei der Endozytose eine Rolle spielen (Meister und Tikkanen 2014) könnte dieser Prozess mit der Beeinträchtigung der Desmosomen zusammenhängen. Die molekularen Mechanismen der Flotillin-gesteuerten Endozytose von desmosomalen Proteinen sind aktuell noch nicht vollständig aufgeklärt.

Im Allgemeinen unterscheidet man bei der Endozytose Clathrin-abhängige und Clathrin-unabhängige Wege. Beim Clathrin-unabhängigen Mechanismus unterscheidet man verschiedene Endozytose-Wege an denen unterschiedliche Proteine bzw. Strukturen (z.B. Caveolin, Clathrin-independent-carriers (CLIC) / Glycosylphosphatidylinositol-anchored protein enriched compartments (GEEC), Interleukin-2-Rezeptor  $\beta$  (IL2R  $\beta$ ), ADP-ribosylation factor 6 (Arf6) und Flotillin) beteiligt sind (Doherty und McMahon 2009; Hansen und Nichols 2009; Sandvig et al. 2011). Der Clathrin-abhängige Endozytose-Weg benötigt Dynamin, wohingegen Clathrin-unabhängige Endozytose-Wege zum Teil auch Dynamin-unabhängig ablaufen. Als GTPase ist Dynamin auch an anderen Trafficking-Prozessen beteiligt (Meister et al. 2014). Mit Hilfe von Dynamin schnüren sich die neu gebildeten endozytotischen Vesikel von der Plasmamembran ab. Dabei bildet das Protein eine spiralförmige Struktur um den Hals des abzuschnürenden Vesikels. Im Zuge der GTP-Hydrolyse legt sich das Dynamin enger um den Hals des Vesikels und spaltet es von der Membran ab. Dynamin ist auch am Export von Proteinen aus dem Golgi-Apparat (Liu et al. 2008) und am Recycling von Proteinen beteiligt (Nicoziani et al. 2000; van Dam et al. 2002; Doherty und McMahon 2009).

Vor einigen Jahren gab es Studien die versuchten die Hypothese zu belegen, dass Flotilline einen autonomen, Clathrin-unabhängigen Mechanismus für die Internalisierung bestimmter Proteine (z.B. CD59, Cholera toxin B-Untereinheit, Proteoglykane, kationische Moleküle) darstellen (Frick et al. 2007; Glebov et al. 2006). Heutzutage ist diese Annahme verworfen und man geht eher davon aus, dass Flotilline an prä-endozytären Mechanismen beteiligt sind. Flotilline spielen dabei eine Rolle in der Clusterbildung von Proteinen an der Plasmamembran (Cremona et al. 2011; Schneider et al. 2008; Amaddii

et al. 2012). Verschiedene Proteine (z.B. Amyloid-Precursor-Protein (APP), Dopamin-Transporter (DAT), EGF-Rezeptor), die durch den Clathrin-abhängigen Weg internalisiert werden, werden zuvor Flotillin-abhängig zu Clustern zusammengefasst (Meister und Tikkanen 2014). Die Internalisierung von Flotillin selbst wird Dynamin- und Clathrin-abhängig durch den EGF-Wachstumsfaktor induziert (Neumann-Giesen et al. 2007; Babuke et al. 2009) .

Die Endozytose von desmosomalen Cadherinen erfolgt über einen Clathrin-unabhängigen Endozytose-Weg, an dem Membrancholesterin und Membranmikrodomänen (Rafts) beteiligt sind (Brennan et al. 2012; Chen et al. 2012; Delva et al. 2008). Laut Chen et al. (2012) erfolgt die Internalisierung von Dsg2 über einen Cholesterin-sensitiven, Dynamin-abhängigen Endozytose-Weg. Dabei hemmt die Desmoglein-Unique-Region (DUR), eine Domäne die sich in Desmogleinen befindet, die Dsg2-Internalisierung und verstärkt die Zelladhäsion. Zudem postulieren die Autoren, dass die Endozytose von Dsg2 von Flot-1 unabhängig ist. Die Ergebnisse in dieser Arbeit deuten gleichfalls daraufhin, dass Flotilline keinen Einfluss auf die Dsg2 Endozytose haben. In Abbildung 19-21 ist zu erkennen, dass die Lokalisation und Morphologie von Dsg2 in Flotillin Knockdown Zellen zwar betroffen sind, aber die Endozytose nach BafA Behandlungen kaum bis keine Auswirkungen auf Dsg2 in Flotillin Knockdown Zellen hat im Vergleich zu Dsg3 (siehe Abbildungen 16-18). Demnach kann man sagen, dass Flotilline zwar die Dsg2 Stabilisierung an der Plasmamembran beeinflussen, jedoch nicht die Degradation bzw. Endozytose von Dsg2. Im Gegensatz dazu wurde in der Studie von Völlner et al. (2016) und in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen Flotillinen und Dsg3 hinsichtlich der Stabilisierung an der Plasmamembran sowie auch der Endozytose aufgezeigt.

Caveolin ist ein weiteres membranständiges Protein, das in sackförmigen Einbuchtungen der Plasmamembran an Endozytose-Prozessen beteiligt ist (Chen et al. 2012). Wie Experimente von Chen et al. (2012) mit Caveolin-Knockdown-Zellen belegen, scheint die Endozytose von desmosomalen Cadherinen weitgehend Caveolin-unabhängig zu sein. Die Autoren schließen aber nicht aus, dass desmosomale Cadherine zu einem geringen Anteil auch Caveolin-1 zur Internalisierung nutzen. Desmosomale Cadherine wie Dsg2 können mit Caveolin-1 interagieren (Brennan et al. 2012).

Die Notwendigkeit von Dynamin bei der Endozytose von desmosomalen Cadherinen wird kontrovers diskutiert. Delva et al. (2008) fanden bei einer Überexpression einer do-

minant negativen Dynamin-2-Mutante Lys44Ala30 eine Dynamin-unabhängige Endozytose von Dsg3 nach Induktion mit *Pemphigus vulgaris* Antikörpern. Dagegen wiesen Chen et al. (2012) mithilfe eines Dynamin-Inhibitors (Dynasore) die Abhängigkeit der Dsg2-Endozytose von Dynamin nach. Völlner et al. (2016) gehen davon aus, dass die durch *Pemphigus vulgaris* Antikörper vermittelte Dsg3-Endozytose sich von der physiologischen Endozytose unterscheidet, da sie mit Dynamin-Inhibitoren (MitMAB, Dynasore) nachweisen konnten, dass die physiologische Endozytose von Dsg3 in HaCaT-Zellen Dynamin-abhängig verläuft. Darüber hinaus verbesserten die beiden Dynamin-Inhibitoren in Flotillin-depletierten HaCaT-Zellen die Fehllokalisierung von Dsg3, so dass die Verteilung des Proteins annähernd der in den Kontrollzellen entsprach. Zudem ist die von Delva et al. (2008) verwendete Dynamin-Mutante nicht spezifisch genug, um eine Dynamin-Abhängigkeit komplett auszuschließen (Völlner et al. 2016).

Kürzlich wurde gezeigt, dass Flotilline an dem ESCRT-(endosomal sorting complexes required for transport)-vermittelten Transport von ubiquitinierten Frachtproteinen in Lysosomen beteiligt sind (Meister et al. 2017). In Flotillin-Knockdown-Zellen sammelt sich der ubiquitinierte EGF-Rezeptor in späten Endosomen an, was zur Vergrößerung dieser Vesikel führt. Flot-1 interagiert mit den Untereinheiten von ESCRT-0- und ESCRT-I-Komplexen. Diese Befunde führten zu der Annahme, dass ESCRT-Komplexe Flotilline benötigen, um miteinander zu interagieren und um ubiquitinierte Proteine zu erkennen und zu sortieren. Weiter scheinen Flotilline, ähnlich wie manche andere Proteine, eine Clusterfunktion an der Membran zu übernehmen (Amaddii et al. 2012; Schneider et al. 2008) und so den ESCRT-vermittelten Abbau in Lysosomen vorzubereiten.

Auf der Basis der Befunde der vorliegenden Studie stellt sich die Frage, ob desmosomale Proteine ebenfalls ubiquitiniert werden und mithilfe von Flotillinen über den ESCRT-vermittelten Weg zu den Lysosomen gelangen. Neben dem lysosomalen System findet man das UPS System, ein weiterer intrazellulärer Abbauweg, das mit Proteasomen funktioniert. Löffek et al. (2012) fanden einen Zusammenhang zwischen dem desmosomalen Protein DP und dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Sie demonstrierten, dass bei einer UPS-Hemmung durch niedrige Calcium-Konzentration der Abbau von DP durch UPS inhibiert wird, wodurch es an den Zell-Zell-Kontaktstellen akkumulierte und die Zellkontakte stabilisierte. Andere desmosomale Proteine wie Dsg1 und  $\gamma$ -Cat reagierten auf eine UPS-Hemmung dagegen nicht mit einer Akkumulation an den Kontaktstellen

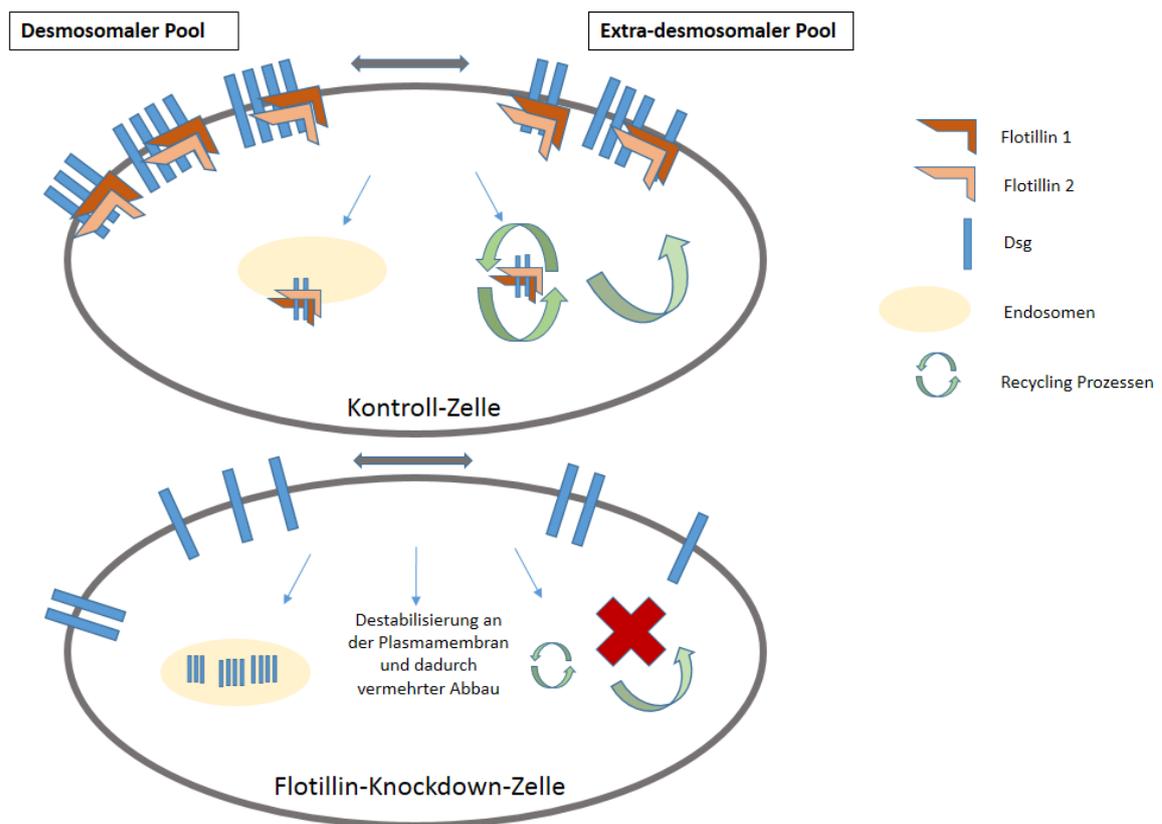
(Löffek et al. 2012). Verschiedene Studien zeigten eine Beteiligung des UPS am Umsatz des Adhärenzverbindungs Proteins  $\beta$ -Cat (Salomon et al. 1997; Sadot et al. 2000).

Das UPS übernimmt zahlreiche regulatorische Funktionen in der Zelle. Dazu zählen der Abbau von Proteinen, die Zellzyklusprogression, Signaltransduktion, Transkriptionsregulation, die Entfernung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche und die Endozytose. Störungen des UPS haben potentiell schwerwiegende Erkrankungen wie Alzheimer oder eine Tumorprogression zur Folge. Das hochkonservierte Ubiquitin ist in der Lage, verschiedene Proteine zu modifizieren. Die Anzahl der mit einem Protein ligierten Ubiquitine und die Position der Ligation steuern die Verteilung der Proteine in der Zelle. Die kovalente Ligation von Ubiquitin an Proteinen wird durch drei Enzyme (E1–E3) katalysiert. Dabei werden Mono-, Oligo-, Multi- und Poly-Ubiquitinierungen unterschieden. Poly-ubiquitinierten Zielproteine werden in Abhängigkeit von der Verknüpfungsstelle dem Proteasom (Lysin 48) oder Lysosomen (Lysin 63) zugeführt. Mono- und Multi-Ubiquitinierungen ermöglichen auch die Interaktion mit weiteren Proteinen. Oligo-ubiquitinierte Proteine fungieren als Transkriptionsregulatoren. Da das UPS zahlreiche Prozesse in der Zelle beeinflusst, sollte seine Rolle für die Verteilung desmosomaler Proteine analysiert werden. Weiterhin bleibt die Frage nach der Beteiligung von Flotillin- und ESCRT-vermittelten endosomalen Sortierung von Desmogleinen offen (Hershko 1998; Peters et al. 1998).

In der vorliegenden Studie wurde mithilfe von Proteinbestimmungen und Immunfluoreszenzfärbungen das Verhalten von desmosomalen Proteinen in Flotillin-Knockdown-Zellen nach Hemmung des lysosomalen Abbauwegs beobachtet. Dabei zeigte sich wie erwartet eine intrazelluläre Akkumulation von Dsg3 in Lysosomen und eine signifikante Erhöhung des Proteinlevels von Dsg3 (Völlner et al. 2016). Diese Befunde deuten darauf hin, dass es beim Fehlen von Flotillinen zu einer gesteigerten Endozytose von Dsg3 gefolgt von einem lysosomalen Abbau kommt. Die Untersuchung der Lokalisation von Dsg2 in Flotillin-Knockdown-HaCaT-Zellen nach Inhibition des lysosomalen Abbauweges ergab nur eine minimale Anreicherung von Dsg2 in den Lysosomen. Diese Unterschiede zwischen Dsg2 und Dsg3 deuten an, dass sich der Abbaumechanismus von verschiedenen desmosomalen Cadherinen unterscheidet. Für die detektierten Unterschiede in dem verwendeten experimentellen Modell kommen aber verschiedene Ursachen in Frage. Zum einen könnte Dsg2 anders als Dsg3 nicht vollständig lysosomal abgebaut werden, sondern über einen Recycling-Prozess transportiert werden. Zum anderen könnten Flotilline in HaCaT-Keratinocyten am Abbau von Dsg2 weniger stark beteiligt sein

als am Abbau von Dsg3. Die Tatsache, dass Flotilline Dsg3 an der Plasmamembran stabilisieren spricht auch dafür.

Auf der Basis der direkten Bindung von Flotillinen an desmosomale Cadherine und  $\gamma$ -Cat, dem gesteigerten Umsatz von Dsg3 und der veränderten Morphologie und Fehllokalisierung von desmosomalen Proteinen in Flotillin-Knockdown-Zellen wurde ein Modell entwickelt, das den Einfluss von Flotillinen auf desmosomale Proteine auf molekularer Ebene beschreibt.



**Abbildung 24: Einfluss von Flotillin 1 und 2 auf desmosomale Cadherine**

In einer Kontrollzelle, in der Flotilline in einer normalen Konzentration gebildet werden, werden desmosomale Cadherine an der Plasmamembran stabilisiert, sodass stabile Desmosomen gebildet werden und somit eine stabile Haftbindung zwischen den Zellen möglich ist. Flotilline scheinen zudem den Abbau einiger desmosomaler Cadherine zu regulieren. Neben Recycling-Mechanismen sind sie an prä-endozytären Prozessen beteiligt und regulieren so den desmosomalen Abbau. In Flotillin-Knockdown-Zellen, in der Flotilline kaum produziert werden, scheinen diese Mechanismen gestört zu sein, sodass es zu vermehrter Degradation von desmosomalen Cadherinen kommt und ein verminderter Proteinlevel bestimmter desmosomaler Cadherine (Dsg3) zu beobachten ist.

Die erste Annahme ist, dass Flotilline ein Gerüst bilden, um desmosomale Cadherine an der Plasmamembran in Clustern zusammenzufassen und zu stabilisieren, ähnlich wie im EGF-Rezeptor-Signalweg (Amaddii et al. 2012). Daher äußert sich das Fehlen von Flotillinen in HaCaT-Knockdown-Zellen in einer Fehllokalisierung von desmosomalen Proteinen und einem gesteigerten Umsatz, der insgesamt zu einer verminderten und geschwächten desmosomalen Adhäsion führt (Völlner et al. 2016). Die zweite Annahme beruht darauf, dass Flotilline an Recycling-Prozessen in Endosomen, die für desmosomale Cadherine essentiell sind, beteiligt sind. Somit wird durch das Fehlen von Flotillinen das Recycling von desmosomalen Cadherinen gestört und daher werden sie vermehrt abgebaut. Nach der letzten Annahme existieren mehrere Endozytose-Wege. Fehlen Flotilline, wird der schnellere Endozytose-Weg aktiviert, was zu einem gesteigerten Abbau von manchen desmosomalen Proteinen, vor allem Dsg3, und letztlich zu einer Schwächung der Zelladhäsion führt.

## V Ausblick

Einige Aspekte inwieweit Flotilline einen differenzierten Einfluss auf desmosomale Cadherine haben können, wurden in dieser Arbeit dargestellt. Es stellt sich nun die Frage, nach welchen Kriterien bzw. Bedingungen Flotilline so einen differenzierten Einfluss ausüben können. Sind dies gewebeabhängige Faktoren, die in Betracht gezogen werden sollten? Zumal bekannt ist, dass desmosomale Cadherine gewebespezifische Expressionsmuster haben (Schäfer et al. 1996; Ungewiß et al. 2017; Kessler et al. 2019). Eine Untersuchung der Interaktion zwischen Flotillinen und desmosomalen Cadherinen in verschiedenen Gewebearten (z.B. Herzmuskelzellen und Darmzellen) wäre von Vorteil, um dies zu verstehen.

Darüber hinaus wurde in dieser und in weiteren Studien nahe gelegt, dass Flotilline am ehesten durch eine Regulation der Endozytose bestimmte desmosomale Cadherine (Dsg3) beeinflussen können. Durch die erlangten Ergebnisse sind einige Annahmen entstanden: Auf der einen Seite könnten Flotilline ein Art Gerüst für desmosomale Cadherine darstellen und stabilisieren diese an der Plasmamembran, auf der anderen Seite könnten Flotilline eine entscheidende Rolle bei Recycling-Prozessen in Endosomen für bestimmte desmosomale Cadherine tragen. Ein Forschungsansatz zur detaillierten Differenzierung der oben genannten Hypothesen ist notwendig.

Desweiteren scheinen desmosomale Cadherine wie Dsg2 einen anderen Abbau-Mechanismus zu haben als Dsg3. Hier wäre die Erforschung der unterschiedlichen Endozytose-Wege bei desmosomalen Cadherinen interessant, besonders da in anderen Studien gezeigt wurde, dass Flotilline auch am UPS Abbauweg interagieren können.

## **I. Zusammenfassung**

### **Einleitung**

Desmosomen kommen als wichtige Strukturen der Zell-Zell-Adhäsion vermehrt in Geweben mit hoher mechanischer Belastung vor. Die desmosomale Adhäsion benachbarter Zellen erfolgt über membranständige desmosomale Cadherine. Intrazellulär werden die Cadherine durch Proteine der Armadillo Proteinfamilie (Plakophilin (PKP) und  $\gamma$ -Catenin (PG)) an Desmoplakin geknüpft, welches wiederum die Verbindung zum Zytoskelett herstellt.

Postuliert wird die Existenz zweier Pools an desmosomalen Cadherinen (desmosomaler Pool: fest in Desmosomen verankerte Cadherine; extradesmosomaler Pool: nicht in Desmosomen fest integrierte Cadherine), wodurch eine schnelle Anpassung der Desmosomen möglich wird. Der Abbau desmosomaler Cadherine ist nur unvollständig geklärt. Man geht davon aus, dass der extradesmosomale Pool schneller endozytiert und entweder lysosomal abgebaut oder recycelt wird.

Flotilline (Flot-1, Flot 2) sind zelltyp- und differenzierungsspezifisch an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran in Mikrodomänen oder in Lysosomen, Endosomen, Phagosomen und Exosomen lokalisiert. Die Proteine sind an Transport- und Sortierungsprozessen, Signaltransduktionswegen, der Zellproliferation, der Regulation des Zytoskeletts und an der Endozytose beteiligt. Eine Ko-Lokalisation von Flotillinen und Adhäsionsmolekülen in Membranrafts und Zellkontakt-Strukturen macht eine Interaktion dieser Proteine wahrscheinlich. In verschiedenen Zellen führt eine Flot-1/Flot-2-Depletion zu einer Konzentrationsabnahme desmosomaler Proteine sowie zu einer Störung der Struktur und Anordnung der Adhärenzverbindung und somit der Zellkontakte.

### **Zielsetzung**

Ziel dieser Studie war die Analyse des Einflusses der Flotilline auf desmosomale Cadherine. Dabei stand die Fragestellung im Vordergrund, inwieweit und über welche molekularen Mechanismen Flotilline den Abbauweg desmosomaler Cadherine beeinflussen.

### **Ergebnisse**

Flotillin-Knockdown Zellen zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen eine diffuse Verteilung und Lokalisation von Dsg2 und Dsg3 an der Plasmamembran. Zudem akkumulierten

Dsg2 und Dsg3 stärker im Zytoplasma. Das Fehlen von Flotillinen verminderte das Proteinlevel von Dsg3 signifikant. Dagegen traten keine signifikanten Veränderungen bei den Proteinniveaus von Dsg 1, 2 und PG auf.

Nach Hemmung des lysosomalen Abbauwegs kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Dsg2 und Dsg3 Proteinlevel in den Flotillin-Knockdown-Zellen, was auf einen erhöhten Abbau dieser Proteine beim Fehlen von Flotillinen hindeutet. In Flot-1-/Flot-2-Knockdown-Zellen zeigten Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen eine Ko-Lokalisation lysosomaler Strukturen mit Dsg3 im Zytoplasma. Eine derartige Kolokalisation konnte für Dsg2 und Lysosomen nicht detektiert werden.

### **Schlussfolgerung**

Eine Flotillin-Depletion führt zu einer Destabilisierung desmosomaler Cadherine an der Plasmamembran von HaCaT-Keratinocyten. Der Einfluss der Flotilline auf die Protein-niveaus verschiedener desmosomaler Adhäsionsproeine ist unterschiedlich. Dsg3 wird beim Fehlen der Flotilline verstärkt lysosomal degradiert, während Dsg2 zwar destabilisiert, aber nur zu einem geringen Anteil lysosomal abgebaut wird. Man geht hier von anderen Abbaumechanismen aus, die nicht den lysosomalen Weg entsprechen wie bei Dsg3.

## II. Summary

### Introduction

Desmosomes are prevalent in tissues with high mechanical stress. The desmosomal adhesion of adjacent cells is based on membrane bound desmosomal cadherins, the desmocollins (Dsc 1–3) and desmogleins (Dsg 1–4). Intracellularly, the cadherins are linked by proteins of the armadillo family (plakophilin (PKP) and  $\gamma$ -Catenin (PG)) to desmoplakin, which establishes a connection to the cytoskeleton (intermediate filaments).

The existence of two pools of desmosomal cadherins is postulated (desmosomal pool: cadherins firmly attached to desmosoms; extradesmosomal pool: cadherins that are not firmly integrated into desmosomes), which allows a fast adaption of the desmosomes. The turnover of desmosomal cadherins has not yet been fully elucidated. It has been suggested that endocytosis that leads to lysosomal degradation or recycling occurs faster within the extradesmosomal pool

Flotillins (Flot-1, Flot 2) are localized in a cell type and differentiation specific manner on the cytoplasmic side of the plasma membrane in microdomains or in endosomes, phagosomes and exosomes. They participate in transport processes, signal transduction, cell proliferation, regulation of the cytoskeleton and endocytosis. The co-localization of flotillins and adhesion molecules in membrane rafts and cell adhesion structures implies an interaction between these proteins. In different cell types, Flot-1/Flot-2-depletion leads to a decrease in the level of desmosomal proteins, as well as to a disturbance of the structure and arrangement of adherence junctions and thereby to a disruption of cell contacts.

### Aim of the study

The aim of the study was the analysis of the influence of flotillines on desmosomal cadherins. Priority was given to the question, to what extend and through which mechanisms flotillines influence the degradation processes of desmosomal cadherines.

### Results

Flotillin knockdown cells, in comparison to wildtype cells, showed a diffuse distribution and localization of Dsg2 and Dsg3 at the plasma membrane. Furthermore, Dsg2 and Dsg3 accumulated to a higher extend in vesicular structures in the cytoplasm. The lack of flotillins diminished the protein level of Dsg 3 significantly. In contrast, there were no significant changes in the protein levels of Dsg 1, 2 and PG. The inhibition of the lysosomal

degradation pathway resulted in an accumulation of Dsg 2 and Dsg 3 in flotillin knock-down cells, indicating a higher extend of degradation in the absence of flotillins. Using immunofluorescence double staining, a colocalization of lysosomal structures and Dsg 3 was observed in cytoplasmic vesicles of Flot-1-/Flot-2-knockdown-cells. For Dsg 2, such a colocalization could not be found.

### **Conclusion**

Flotillin depletion leads to a destabilization of desmosomal cadherins in the plasma membrane of HaCaT-keratinocytes. The influence of flotillins on the protein level varies between different desmosomal adhesion proteins. In the absence of flotillins, Dsg3 is efficiently degraded by lysosomes, whereas Dsg2, although being destabilized at the plasma membrane, is degraded to a lesser extend in lysosomes. This suggests a different turnover pathway and different dependency on flotillins for Dsg2 than Dsg3.

### III. Abkürzungsverzeichnis

ARVC.....	<i>Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie</i>
BafA.....	<i>Bafilomycin A</i>
CHX.....	<i>Cycloheximid</i>
DAPI.....	<i>4',6-Diamidino-2-phenylindol, 4',6-Diamidino-2-phenylindol</i>
DMEM.....	<i>Dulbeccos modified Eagle's medium</i>
DP.....	<i>Desmoplakin</i>
<i>Dsc</i> .....	<i>Desmocollin</i>
<i>Dsg</i> .....	<i>Desmoglein</i>
DTD.....	<i>Desmoglein-Terminal-Domän</i>
EA.....	<i>Extrazellulär-Anchor</i>
ECL.....	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA.....	<i>Ethylenediamintetraacetylsäure</i>
EGF-Rezeptor.....	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
F1-shRNA.....	<i>Flotillin-1-Knockdown-Zellen</i>
F2-shRNA.....	<i>Flotillin-2-Knockdown-Zellen</i>
FCS.....	<i>Fötale Kälberserum</i>
GAPDH.....	<i>Glyceraldehyd 3-phosphat Dehydrogenase</i>
GLUT4.....	<i>Glukosetransporter 4</i>
HRP.....	<i>Horseradish peroxidase</i>
IA.....	<i>Intrazelluläre Anchor</i>
ICS.....	<i>Intrazelluläre-Cadherin-Sequenz</i>
IDP.....	<i>Inner-Dense-Plaque</i>
IF.....	<i>Intermediärfilamente</i>
IPL.....	<i>Intrazelluläre-Proline-Linker</i>
LEF.....	<i>Lymphoid-Enhancer-Faktor</i>
MAP.....	<i>Mitogen-Activated-Protein</i>
MeOH.....	<i>Methanol, Methanol</i>
N.....	<i>Amino</i>
ODP.....	<i>Outer-Dense-Plaque</i>
PBS.....	<i>Phosphate buffered saline, Dulbeccos Phosphate Buffered Saline</i>
PG.....	<i>Plakoglobin</i>
PI3K.....	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PKC.....	<i>Proteinkinase C</i>
RUD.....	<i>Repeat-Unit-Domain</i>
SDS.....	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
shControl.....	<i>Kontrollzellen</i>
TBST.....	<i>Tris buffered saline tween</i>
TCF.....	<i>T-Cell-Faktor</i>
TM.....	<i>Transmembran</i>
UV-Strahlung.....	<i>Ultraviolette Strahlung</i>

#### IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Desmosoms zwischen benachbarten Zellen _____	3
Abbildung 2: Struktureller Aufbau der desmosomalen Cadherine _____	5
Abbildung 3: Struktureller Aufbau von Plakoglobin (PG) _____	11
Abbildung 4: Struktureller Aufbau von Plakophilin (PKP) _____	12
Abbildung 5: Struktureller Aufbau von Desmoplakin (DP) _____	16
Abbildung 6: Struktureller Aufbau von Flotillin 1 und 2 _____	19
Abbildung 7: 6-Well-Platte zur Darstellung des Bafilomycin A Experiments _____	31
Abbildung 8: Flot-1 und Flot-2 Knockdown in HaCaT-Keratinocyten hat keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Desmoglein-2 _____	37
Abbildung 9: Knockdown von Flotillinen in HaCaT-Zellen resultiert in einer veränderten Lokalisation und Morphologie von Dsg2 an der Plasmamembran _____	38
Abbildung 10: Kein signifikanter Einfluss von Flot-1- und Flot-2 -Knockdown auf die Expression von DP _____	40
Abbildung 11: In Flotillin-Knockdown-Zellen führt die Inhibierung des lysosomalen Abbaus zu Akkumulierung von Dsg3 und Dsg2 in HaCaT Zellen _____	42
Abbildung 12: Inhibierung des lysosomalen Abbauwegs führt in HaCaT-Zellen zu Akkumulierung von Dsg-3 und Dsg-2 _____	43
Abbildung 13: Akkumulation von Dsg3 in shControl HaCaT-Zellen nach Bafilomycin A- Behandlung _____	46
Abbildung 14: Akkummulation von Dsg-3 in Flot-1-Knockdown-HaCaT-Zellen nach Bafilomycin A-Behandlung _____	47
Abbildung 15: Akkumulation von Dsg-3 in Flot-2-Knockdown-HaCaT-Zellen nach BafA-Behandlung _____	48
Abbildung 16: Kolokalisation von Dsg-3 und Lamp1 in sh-control HaCaT-Zellen nach BafA-Behandlung _____	50
Abbildung 17: Kolokalisation von Dsg-3 und Lamp1 in Flot-1-Knockdown-HaCaT- Zellen nach BafA-Behandlung _____	51
Abbildung 18: Kolokalisation von Dsg-3 und Lamp1 in Flotillin-2-Knockdown-HaCaT- Zellen nach Bafilomycon A-Behandlung _____	52
Abbildung 19: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Dsg2 und Lamp1 nach BafA- Behandlung zeigt keine Kolokalisation in sh-control HaCaT-Zellen _____	54

Abbildung 20: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Dsg2 und Lamp1 nach BafA-Behandlung zeigt keine Kolokalisation in Flot-1-Knockdown-HaCaT-Zellen	55
Abbildung 21: Immunfluoreszenz- Doppelfärbung von Dsg2 und Lamp1 nach Bafilomycin A-Behandlung zeigt keine Kolokalisation in Flotillin-2-Knockdown-HaCaT-Zellen	56
Abbildung 22: Nach einer Behandlung mit dem Translationshemmer Cycloheximid zeigten sich keine signifikanten Veränderungen im Expressionslevel der aufgeführten Zelladhäsionsproteine	58
Abbildung 23: Doppelbehandlung mit BafA und CHX in HaCaT-Zellen ergab keine signifikante Veränderung im Proteinlevel der aufgeführten Zelladhäsionsproteine	59
Abbildung 24: Einfluss von Flotillin 1 und 2 auf desmosomale Cadherine	67

## V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte mit Hersteller Angaben .....	24
Tabelle 2: Auflistung der Verbrauchsmaterialien mit Hersteller Angaben .....	24
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien .....	25
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzung .....	26
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Antibiotika .....	27
Tabelle 6: Auflistung der Primärantikörper .....	27
Tabelle 7: Auflistung der Sekundärantikörper .....	28
Tabelle 8: Verwendete Computerprogramme und Software .....	29
Tabelle 9: Sammel- und Trenngel Zusammensetzung.....	32

## VI. Literaturverzeichnis

Acehan, Devrim; Petzold, Christopher; Gumper, Iwona; Sabatini, David D.; Müller, Eliane J.; Cowin, Pamela; Stokes, David L. (2008): Plakoglobin is required for effective intermediate filament anchorage to desmosomes. In: *The Journal of investigative dermatology* 128 (11), S. 2665–2675. DOI: 10.1038/jid.2008.141.

Al-Amoudi, Ashraf; Castaño-Diez, Daniel; Devos, Damien P.; Russell, Robert B.; Johnson, Graham T.; Frangakis, Achilleas S. (2011): The three-dimensional molecular structure of the desmosomal plaque. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (16), S. 6480–6485. DOI: 10.1073/pnas.1019469108.

Al-Amoudi, Ashraf; Díez, Daniel Castaño; Betts, Matthew J.; Frangakis, Achilleas S. (2007): The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes. In: *nature* 450 (7171), S. 832–837. DOI: 10.1038/nature05994.

Al-Jassar, Caesar; Bikker, Hennie; Overduin, Michael; Chidgey, Martyn (2013): Mechanistic basis of desmosome-targeted diseases. In: *Journal of molecular biology* 425 (21), S. 4006–4022. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.07.035.

Amaddii, Monia; Meister, Melanie; Banning, Antje; Tomasovic, Ana; Mooz, Juliane; Rajalingam, Krishnaraj; Tikkanen, Ritva (2012): Flotillin-1/reggie-2 protein plays dual role in activation of receptor-tyrosine kinase/mitogen-activated protein kinase signaling. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (10), S. 7265–7278. DOI: 10.1074/jbc.M111.287599.

Amagai, M.; Matsuyoshi, N.; Wang, Z. H.; Andl, C.; Stanley, J. R. (2000): Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. In: *Nature medicine* 6 (11), S. 1275–1277. DOI: 10.1038/81385.

Amagai, Masayuki (1999): Autoimmunity against desmosomal cadherins in pemphigus. In: *Journal of dermatological science* 20 (2), S. 92–102. DOI: 10.1016/S0923-1811(99)00016-X.

Amagai, Masayuki; Stanley, John R. (2012): Desmoglein as a target in skin disease and beyond. In: *The Journal of investigative dermatology* 132 (3 Pt 2), S. 776–784. DOI: 10.1038/jid.2011.390.

Amagai, Masayuki; Yamaguchi, Takayuki; Hanakawa, Yasushi; Nishifuji, Koji; Sugai, Motoyuki; Stanley, John R. (2002): Staphylococcal exfoliative toxin B specifically

cleaves desmoglein 1. In: *The Journal of investigative dermatology* 118 (5), S. 845–850. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2002.01751.x.

Angst, Brigitt D.; Marcozzi, Cristiana; Magee, Anthony I. (2001): The cadherin superfamily: diversity in form and function. In: *Journal of cell science* 114, S. 629–641.

Anhalt, Grant J.; Diaz, Luis A. (2001): Research Advances in Pemphigus. In: *JAMA* 285 (5), S. 652. DOI: 10.1001/jama.285.5.652.

Awad, Mark M.; Dalal, Darshan; Cho, Eunpi; Amat-Alarcon, Nuria; James, Cynthia; Tichnell, Crystal et al. (2006): DSG2 mutations contribute to arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. In: *American journal of human genetics* 79 (1), S. 136–142. DOI: 10.1086/504393.

Babuke, Tanja; Ruonala, Mika; Meister, Melanie; Amaddii, Monia; Genzler, Christina; Esposito, Alessandro; Tikkanen, Ritva (2009): Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis. In: *Cellular signalling* 21 (8), S. 1287–1297. DOI: 10.1016/j.cellsig.2009.03.012.

Bass-Zubek, Amanda E.; Hobbs, Ryan P.; Amargo, Evangeline V.; Garcia, Nicholas J.; Hsieh, Sherry N.; Chen, Xinyu et al. (2008): Plakophilin 2. A critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly. In: *The Journal of cell biology* 181 (4), S. 605–613. DOI: 10.1083/jcb.200712133.

Baumann, Christian A.; Ribon, Vered; Kanzaki, Makoto; Thurmond, Debbie C.; Mora, Silvia; Shigematsu, Satoshi et al. (2000): CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. In: *nature* 407, S. 202–207.

Bazzi, Hisham; Christiano, Angela M. (2007): Broken hearts, woolly hair, and tattered skin. When desmosomal adhesion goes awry. In: *Current Opinion in Cell Biology* 19 (5), S. 515–520. DOI: 10.1016/j.ceb.2007.08.001.

Beckert, Benedikt; Panico, Francesca; Pollmann, Robert; Eming, Rüdiger; Banning, Antje; Tikkanen, Ritva (2019): Immortalized Human hTert/KER-CT Keratinocytes a Model System for Research on Desmosomal Adhesion and Pathogenesis of Pemphigus Vulgaris. In: *International journal of molecular sciences* 20 (13). DOI: 10.3390/ijms20133113.

- Bickel, Perry E.; Scherer, Philipp E.; Schnitzer, Jan E.; Oh, Phil; Lisanti, Michael P.; Lodish, Harvey F. (1997): Flotillin and Epidermal Surface Antigen Define a New Family of Caveolae-associated Integral Membrane Proteins. In: *J. Biol. Chem.* 272 (21), S. 13793–13802. DOI: 10.1074/jbc.272.21.13793.
- Blaschuk, Orest W.; Sullivan, Robert; David, S.; Pouliot, Yannick (1990): Identification of a Cadherin Cell Adhesion Recognition Sequence. In: *Developmental biology* 139, S. 227–229.
- Bodrikov, Vsevolod; Solis, Gonzalo P.; Stuermer, Claudia A. O. (2011): Prion protein promotes growth cone development through reggie/flotillin-dependent N-cadherin trafficking. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (49), S. 18013–18025. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4729-11.2011.
- Bonné, S.; van Hengel, J.; van Roy, F. (1998): Chromosomal mapping of human armadillo genes belonging to the p120(ctn)/plakophilin subfamily. In: *Genomics* 51 (3), S. 452–454. DOI: 10.1006/geno.1998.5398.
- Bonné, Stefan; van Hengel, Jolanda; Nollet, Friedel; Kools, Patrick; van Roy, Frans (1999): Plakophilin-3, a novel Armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. In: *Journal of cell science* 112, S. 2265–2276.
- Bornslaeger, Elayne A.; Corcoran, Connie M.; Stappenbeck, Thaddeus S.; Green, Kathleen J. (1996): Breaking the Connection: Displacement of the Desmosomal Plaque Protein Desmoplakin from Cell-Cell Interfaces Disrupts Anchorage of Intermediate Filament Bundles and Alters Intercellular Junction Assembly 134 (4), S. 985–1001.
- Bornslaeger, Elayne A.; Godsel, Lisa M.; Corcoran, Connie M.; Park, Jung K.; Hatzfeld, Mechthild; Kowalczyk, Andrew P.; Green, Kathleen J. (2000): Plakophilin 1 interferes with plakoglobin binding to desmoplakin, yet together with plakoglobin promotes clustering of desmosomal plaque complexes at cellcell borders. In: *Journal of cell science* 114, S. 727–738.
- Bouameur, Jamal-Eddine; Favre, Bertrand; Borradori, Luca (2014): Plakins, a versatile family of cytolinkers. Roles in skin integrity and in human diseases. In: *The Journal of investigative dermatology* 134 (4), S. 885–894. DOI: 10.1038/jid.2013.498.
- Boukamp, P.; Petrussevska, R. T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N. E. (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human

- keratinocyte cell line. In: *The Journal of cell biology* 106 (3), S. 761–771. DOI: 10.1083/jcb.106.3.761.
- Brennan, D.; Peltonen, S.; Dowling, A.; Medhat, W.; Green, K. J.; Wahl, J. K. et al. (2012): A role for caveolin-1 in desmoglein binding and desmosome dynamics. In: *Oncogene* 31 (13), S. 1636–1648. DOI: 10.1038/onc.2011.346.
- Brennan, Donna; Hu, Ying; Joubeh, Sohaila; Choi, Yoo Won; Whitaker-Menezes, Diana; O'Brien, Thomas et al. (2007): Suprabasal Dsg2 expression in transgenic mouse skin confers a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype to keratinocytes. In: *Journal of cell science* 120 (Pt 5), S. 758–771. DOI: 10.1242/jcs.03392.
- Brennan, Donna; Mahoney, Mÿ G. (2014): Increased expression of Dsg2 in malignant skin carcinomas. In: *Cell Adhesion & Migration* 3 (2), S. 148–154. DOI: 10.4161/cam.3.2.7539.
- Browman, Duncan T.; Hoegg, Maja B.; Robbins, Stephen M. (2007): The SPFH domain-containing proteins. More than lipid raft markers. In: *Trends in cell biology* 17 (8), S. 394–402. DOI: 10.1016/j.tcb.2007.06.005.
- Calkins, Cath arine C.; Setzer, Shannon V.; Jennings, Jean Marie; Summers, Susan; Tsunoda, Kazuyuki; Amagai, Masayuki; Kowalczyk, Andrew P. (2006): Desmoglein endocytosis and desmosome disassembly are coordinated responses to pemphigus autoantibodies. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (11), S. 7623–7634. DOI: 10.1074/jbc.M512447200.
- Chartier, Nicolas T.; Lain e, Mich ele G.; Ducarouge, Benjamin; Oddou, Christiane; Bonaz, Bruno; Albiges-Rizo, Corinne; Jacquier-Sarlin, Muriel R. (2011): Enterocytic differentiation is modulated by lipid rafts-dependent assembly of adherens junctions. In: *Experimental cell research* 317 (10), S. 1422–1436. DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.03.009.
- Chavanas, St ephane; Bodemer, Christine; Rochat, Ariane; Hamel-Teillac, Dominique; Ali, Mohsin; Irvine, Alan D. et al. (2000): Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. In: *Nature genetics* 25.
- Chen, Jiangli; Den, Zhining; Koch, Peter J. (2008): Loss of desmocollin 3 in mice leads to epidermal blistering. In: *Journal of cell science* 121 (Pt 17), S. 2844–2849. DOI: 10.1242/jcs.031518.

Chen, Jing; Nekrasova, Oxana E.; Patel, Dipal M.; Klessner, Jodi L.; Godsel, Lisa M.; Koetsier, Jennifer L. et al. (2012): The C-terminal unique region of desmoglein 2 inhibits its internalization via tail-tail interactions. In: *The Journal of cell biology* 199 (4), S. 699–711. DOI: 10.1083/jcb.201202105.

Chen, Y-J; Chang, J. T.; Lee, L.; Wang, H-M; Liao, C-T; Chiu, C-C et al. (2007): DSG3 is overexpressed in head neck cancer and is a potential molecular target for inhibition of oncogenesis. In: *Oncogene*, S. 467–476.

Chidgey, M.; Brakebusch, C.; Gustafsson, E.; Cruchley, A.; Hail, C.; Kirk, S. et al. (2001): Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation. In: *The Journal of cell biology* 155 (5), S. 821–832. DOI: 10.1083/jcb.200105009.

Chitaev, Nikolai A.; Leube, Rudolf E.; Troyanovsky, Regina B.; Eshkind, Leonid G.; Franke, Werner W.; Troyanovsky, Sergey M. (1996): The Binding of Plakoglobin to Desmosomal Cadherins: Patterns of Binding Sites and Topogenic Potential. In: *The Journal of Cell Biology*, 133 (2), S. 359–369.

Chitaev, Nikolai A.; Troyanovsky, Sergey M. (1997): Direct  $Ca^{2+}$ -dependent Heterophilic Interaction between Desmosomal Cadherins, Desmoglein and Desmocollin, Contributes to Cell–Cell Adhesion. In: *The Journal of cell biology* 138 (1), S. 193–201.

Choi, Hee-Jung; Weis, William I. (2005): Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. In: *Journal of molecular biology* 346 (1), S. 367–376. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.11.048.

Collins, Jane E.; Legan, P. Kevin; Kenny, Terry P.; MacGarvie, Jennie; Holton, Janice L.; Garrod, David R. (1991): Cloning and sequence analysis of desmosomal glycoproteins 2 and 3 (desmocollins). Cadherin-like desmosomal adhesion molecules with heterogeneous cytoplasmic domains. In: *The Journal of cell biology* 113 (2), S. 381–391. DOI: 10.1083/jcb.113.2.381.

Cowin, Pamela; Kapprell, Hans-Peter; Franke, Werner W.; Tamkun, John; Hynes, Richard O. (1986): Plakoglobin: A Protein Common to Different Kinds of Intercellular Adhering Junctions. In: *Cell Press* 46, S. 1063–1073.

- Cremona, M. Laura; Matthies, Heinrich J. G.; Pau, Kelvin; Bowton, Erica; Speed, Nicole; Lute, Brandon J. et al. (2011): Flotillin-1 is essential for PKC-triggered endocytosis and membrane microdomain localization of DAT. In: *Nature neuroscience* 14 (4), S. 469–477. DOI: 10.1038/nn.2781.
- Delva, Emmanuella; Jennings, Jean Marie; Calkins, Catharine C.; Kottke, Margaret D.; Faundez, Victor; Kowalczyk, Andrew P. (2008): Pemphigus vulgaris IgG-induced desmoglein-3 endocytosis and desmosomal disassembly are mediated by a clathrin- and dynamin-independent mechanism. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (26), S. 18303–18313. DOI: 10.1074/jbc.M710046200.
- Delva, Emmanuella; Tucker, Dana K.; Kowalczyk, Andrew P. (2009): The desmosome. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1 (2), a002543. DOI: 10.1101/cshperspect.a002543.
- Demlehner, Martin P.; Schiffer, Stephan; Grund, Christine; Franke, Werner W. (1995): Continual Assembly of Half-Desmosomal Structures in the Absence of Cell Contacts and Their Frustrated Endocytosis: A Coordinated Sisyphus Cycle. In: *The Journal of cell biology* 131 (3), S. 745–760.
- Den, Zhining; Cheng, Xing; Merched-Sauvage, Maria; Koch, Peter J. (2006): Desmocollin 3 is required for pre-implantation development of the mouse embryo. In: *Journal of cell science* 119 (Pt 3), S. 482–489. DOI: 10.1242/jcs.02769.
- Dermine, J. F.; Duclos, S.; Garin, J.; St-Louis, F.; Rea, S.; Parton, R. G.; Desjardins, M. (2001): Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (21), S. 18507–18512. DOI: 10.1074/jbc.M101113200.
- Descargues, Pascal; Deraison, Céline; Bonnart, Chrystelle; Kreft, Maaïke; Kishibe, Mari; Ishida-Yamamoto, Akemi et al. (2005): Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. In: *Nature genetics* 37 (1), S. 56–65. DOI: 10.1038/ng1493.
- Dhitavat, Jittima; Cobbold, Christian; Leslie, Natalie; Burge, Susan; Hovnanian, Alain (2003): Impaired trafficking of the desmoplakins in cultured Darier's disease keratinocytes. In: *The Journal of investigative dermatology* 121 (6), S. 1349–1355. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2003.12557.x.

- Doherty, Gary J.; McMahon, Harvey T. (2009): Mechanisms of endocytosis. In: *Annual review of biochemistry* 78, S. 857–902. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540.
- Dusek, Rachel L.; Attardi, Laura D. (2011): Desmosomes. New perpetrators in tumour suppression. In: *Nature reviews. Cancer* 11 (5), S. 317–323. DOI: 10.1038/nrc3051.
- Dusek, Rachel L.; Getsios, Spiro; Chen, Feng; Park, Jung K.; Amargo, Evangeline V.; Cryns, Vincent L.; Green, Kathleen J. (2006): The differentiation-dependent desmosomal cadherin desmoglein 1 is a novel caspase-3 target that regulates apoptosis in keratinocytes. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (6), S. 3614–3624. DOI: 10.1074/jbc.M508258200.
- Edgar, Alasdair J.; Polak, Julia M. (2001): Flotillin-1: gene structure: cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33, S. 53–64.
- Elias, Peter M.; Matsuyoshi, Norihisa; Wu, Hong; Lin, Chenyan; Wang, Zhi Hong; Brown, Barbara E.; Stanley, John R. (2001): Desmoglein Isoform Distribution Affects Stratum Corneum Structure and Function. In: *J Cell Biol* 153 (2), S. 243–250. DOI: 10.1083/jcb.153.2.243.
- Eshkind, Leonid; Tian, Qi; Schmidt, Ansgar; Franke, Werner W.; Windoffer, Reinhard; Leube, Rudolf E. (2002): Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. In: *European journal of cell biology* 81 (11), S. 592–598. DOI: 10.1078/0171-9335-00278.
- Fleming, T. P.; Ghassemifar, M. R.; Sheth, B. (2000): Junctional complexes in the early mammalian embryo. In: *Seminars in reproductive medicine* 18 (2), S. 185–193. DOI: 10.1055/s-2000-12557.
- Fleming, Tom P.; Butler, Liz; Lei, Xiaoi; Collins, Jane; Javed, Qamar; Sheth, Bhav et al. (1994): Molecular maturation of cell adhesion systems during mouse early development. In: *Histochemistry* 101, S. 1–7.
- Fleming, Tom P.; Garrod, David R.; Elsmore, Andrew J. (1991): Desmosome biogenesis in the mouse preimplantation embryo. In: *Development* 112, S. 527–539.

Franke, Werner W.; Borrmann, Carola M.; Grund, Christine; Pieperhoff, Sebastian (2006): The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. In: *European journal of cell biology* 85 (2), S. 69–82. DOI: 10.1016/j.ejcb.2005.11.003.

Franke, Werner W.; Goldschmidt, Michaela D.; Zimbelmann, Ralf; Mueller, Hubert M.; Schiller, Dorothea L.; Cowin, Pamela (1989): Molecular cloning and amino acid sequence of human plakoglobin, the common junctional plaque protein. In: *Biochemistry* 86, S. 4027–4031.

Frick, Manfred; Bright, Nicholas A.; Riento, Kirsi; Bray, Aurélie; Merrified, Christien; Nichols, Benjamin J. (2007): Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. In: *Current biology : CB* 17 (13), S. 1151–1156. DOI: 10.1016/j.cub.2007.05.078.

Furukawa, Chiyuki; Daigo, Yataro; Ishikawa, Nobuhisa; Kato, Tatsuya; Ito, Tomoo; Tsuchiya, Eiju et al. (2005): Plakophilin 3 oncogene as prognostic marker and therapeutic target for lung cancer. In: *Cancer research* 65 (16), S. 7102–7110. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1877.

Gallicano, G. Ian; Kouklis, Panos; Bauer, Christoph; Yin, Mei; Vasioukhin, Valeri; Degenstein, Linda; Fuchs, Elaine (1998): Desmoplakin Is Required Early in Development for Assembly of Desmosomes and Cytoskeletal Linkage. In: *The Journal of cell biology* 143 (7), S. 2009–2022.

Garrod, David; Chidgey, Martyn (2008): Desmosome structure, composition and function. In: *Biochimica et biophysica acta* 1778 (3), S. 572–587. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.07.014.

Garrod, David R.; Berika, Mohamed Y.; Bardsley, William F.; Holmes, David; Taberner, Lydia (2005): Hyper-adhesion in desmosomes. Its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. In: *Journal of cell science* 118 (Pt 24), S. 5743–5754. DOI: 10.1242/jcs.02700.

Garrod, David R.; Merritt, Anita J.; Nie, Zhuxiang (2002a): Desmosomal adhesion. Structural basis, molecular mechanism and regulation (Review). In: *Molecular membrane biology* 19 (2), S. 81–94. DOI: 10.1080/09687680210132476.

- Garrod, David R.; Merritt, Anita J.; Nie, Zhuxiang (2002b): Desmosomal cadherins. In: *Journal of Cell Biology* 14, S. 537–545.
- Gassart, Aude de; Geminard, Charles; Fevrier, Benoit; Raposo, Graca; Vidal, Michel (2003): Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. In: *Blood* 102 (13), S. 4336–4344. DOI: 10.1182/blood-2003-03-0871.
- Gerull, Brenda; Heuser, Arnd; Wichter, Thomas; Paul, Matthias; Basson, Craig T.; McDermott, Deborah A. et al. (2004): Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. In: *Nature genetics* 36 (11), S. 1162–1164. DOI: 10.1038/ng1461.
- Getsios, Spiro; Huen, Arthur C.; Green, Kathleen J. (2004): Working out the strength and flexibility of desmosomes. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (4), S. 271–281. DOI: 10.1038/nrm1356.
- Getsios, Spiro; Simpson, Cory L.; Kojima, Shin-ichiro; Harmon, Robert; Sheu, Linda J.; Dusek, Rachel L. et al. (2009): Desmoglein 1-dependent suppression of EGFR signaling promotes epidermal differentiation and morphogenesis. In: *The Journal of cell biology* 185 (7), S. 1243–1258. DOI: 10.1083/jcb.200809044.
- Gkantiragas, I.; Brugger, B.; Stuken, E.; Kaloyanova, D.; Li, X.-Y.; Lohr, K. et al. (2001): Sphingomyelin-enriched Microdomains at the Golgi Complex. In: *Molecular biology of the cell* 12 (6), S. 1819–1833. DOI: 10.1091/mbc.12.6.1819.
- Glebov, Oleg O.; Bright, Nicholas A.; Nichols, Benjamin J. (2006): Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. In: *Nature Cell Biology* 8 (1), S. 46–54. DOI: 10.1038/ncb1342.
- Godsel, Lisa M.; Hsieh, Sherry N.; Amargo, Evangeline V.; Bass, Amanda E.; Pascoe-McGillicuddy, Lauren T.; Huen, Arthur C. et al. (2005): Desmoplakin assembly dynamics in four dimensions. Multiple phases differentially regulated by intermediate filaments and actin. In: *The Journal of cell biology* 171 (6), S. 1045–1059. DOI: 10.1083/jcb.200510038.
- Green, Kathleen J.; Getsios, Spiro; Troyanovsky, Sergey; Godsel, L. M. (2010): Inter-cellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2 (2), a000125. DOI: 10.1101/cshperspect.a000125.

Guillaume, Emilie; Comunale, Franck; Do Khoa, Nam; Planchon, Damien; Bodin, Stéphane; Gauthier-Rouvière, Cécile (2013): Flotillin microdomains stabilize cadherins at cell-cell junctions. In: *Journal of cell science* 126 (Pt 22), S. 5293–5304. DOI: 10.1242/jcs.133975.

Ha, Hyunil; Kwak, Han Bok; Lee, Seung Ku; Na, Doe Sun; Rudd, Christopher E.; Lee, Zang Hee; Kim, Hong-Hee (2003a): Membrane rafts play a crucial role in receptor activator of nuclear factor kappaB signaling and osteoclast function. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (20), S. 18573–18580. DOI: 10.1074/jbc.M212626200.

Ha, Hyunil; Kwak, Han Bok; Lee, Seung Ku; Na, Doe Sun; Rudd, Christopher E.; Lee, Zang Hee; Kim, Hong-Hee (2003b): Membrane rafts play a crucial role in receptor activator of nuclear factor kappaB signaling and osteoclast function. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (20), S. 18573–18580. DOI: 10.1074/jbc.M212626200.

Hakimelahi, Shahram; Parker, Henry R.; Gilchrist, Anita J.; Barry, Michele; Li, Zhi; Bleackley, R. Chris; Pasdar, Manijeh (2000): Plakoglobin Regulates the Expression of the Anti-apoptotic Protein BCL-2. In: *J. Biol. Chem.* 275 (15), S. 10905–10911. DOI: 10.1074/jbc.275.15.10905.

Hansen, Carsten G.; Nichols, Benjamin J. (2009): Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. In: *Journal of cell science* 122 (Pt 11), S. 1713–1721. DOI: 10.1242/jcs.033951.

Hardman, Matthew J.; Liu, Ke; Avilion, Ariel A.; Merritt, Anita; Brennan, Keith; Garrod, David R.; Byrne, Carolyn (2005): Desmosomal cadherin misexpression alters beta-catenin stability and epidermal differentiation. In: *Molecular and Cellular Biology* 25 (3), S. 969–978. DOI: 10.1128/MCB.25.3.969-978.2005.

Harmon, Robert M.; Simpson, Cory L.; Johnson, Jodi L.; Koetsier, Jennifer L.; Dubash, Adi D.; Najor, Nicole A. et al. (2013): Desmoglein-1/Erbin interaction suppresses ERK activation to support epidermal differentiation. In: *The Journal of clinical investigation* 123 (4), S. 1556–1570. DOI: 10.1172/JCI65220.

Hartlieb, Eva; Kempf, Bettina; Partilla, Miriam; Vigh, Balázs; Spindler, Volker; Waschke, Jens (2013): Desmoglein 2 is less important than desmoglein 3 for keratinocyte cohesion. In: *PloS one* 8 (1), e53739. DOI: 10.1371/journal.pone.0053739.

- Hatzfeld, Mechthild (2007): Plakophilins. Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? In: *Biochimica et biophysica acta* 1773 (1), S. 69–77. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.04.009.
- Hatzfeld, Mechthild; Haffner, Christof; Schulze, Katrin; Vinzens, Ute (2000): The Function of Plakophilin 1 in Desmosome Assembly and Actin Filament Organization. In: *J Cell Biol* 149 (1), S. 209–222. DOI: 10.1083/jcb.149.1.209.
- Hazarika, Parul; McCarty, Marya F.; Prieto, Victor G.; George, Saira; Babu, Daniel; Koul, Dimpay et al. (2004): Up-regulation of Flotillin-2 Is Associated with Melanoma Progression and Modulates Expression of the Thrombin Receptor Protease Activated Receptor 1. In: *Cancer research* 64, S. 7361–7369.
- He, Wanzhong; Cowin, Pamela; Stokes, David L. (2003): Untangling Desmosomal Knots with Electron Tomography. In: *Science* 302.
- Heid, Hans W.; Schmidt, Ansgar; Zimbelmann, Ralf; Schäfer, Stephan; Winter-Simanski, Stefanie; Stumpp, Sabine et al. (1994): Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: plakophilin 1 (band 6 protein). In: *Differentiation* 58, S. 113–131.
- Hershko, Avram (1998): The Ubiquitin System. In: Jan-Michael Peters, J. Robin Harris und Daniel Finley (Hg.): *Ubiquitin and the Biology of the Cell*. Boston, MA: Springer US, S. 1–17.
- Heupel, W.-M.; Zillikens, D.; Drenckhahn, D.; Waschke, J. (2008): Pemphigus Vulgaris IgG Directly Inhibit Desmoglein 3-Mediated Transinteraction. In: *The Journal of Immunology* 181 (3), S. 1825–1834. DOI: 10.4049/jimmunol.181.3.1825.
- Huber, O. (2003): Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60 (9), S. 1872–1890. DOI: 10.1007/s00018-003-3050-7.
- Huelsken, Joerg; Behrens, Juergen (2002): The Wnt signalling pathway. In: *Journal of cell science* 115 (21), S. 3977–3978. DOI: 10.1242/jcs.00089.
- Hunt, D. M.; Rickman, L.; Whittock, N. V.; Eady, R. A.; Simrak, D.; Dopping-Hepenstal, P. J. et al. (2001): Spectrum of dominant mutations in the desmosomal cadherin desmoglein 1, causing the skin disease striate palmoplantar keratoderma. In: *European journal of human genetics : EJHG* 9 (3), S. 197–203. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200605.

Hunt, Debbi M.; Sahota, Virender K.; Taylor, Kai.; Simrak, Danijela.; Hornigold, Nick.; Arnemann, Joachim et al. (1999): Clustered Cadherin Genes: A Sequence-Ready Contig for the Desmosomal Cadherin Locus on Human Chromosome 18. In: *Genomics* 62, S. 445–455.

Jackson, Brian W.; Grund, Christine; SCHMID, ERIKA; BÜRKI, KURT; Franke, Werner W.; Ilmensee, Karl (1980): Formation of Cytoskeletal Elements During Mouse Embryogenesis. In: *Differentiation* 17 (1-3), S. 161–179. DOI: 10.1111/j.1432-0436.1980.tb01093.x.

Johnson, Jodi L.; Najor, Nicole A.; Green, Kathleen J. (2014): Desmosomes. Regulators of cellular signaling and adhesion in epidermal health and disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4 (11), a015297. DOI: 10.1101/cshperspect.a015297.

Kessler, Elise L.; van Stuijvenberg, Leonie; van Bavel, Joanne J. A.; van Bennekom, Joëlle; Zwartsen, Anne; Rivaud, Mathilde R. et al. (2019): Flotillins in the intercalated disc are potential modulators of cardiac excitability. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 126, S. 86–95. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.11.007.

Khan, K.; Hardy, R.; Haq, A.; Ogunbiyi, O.; Morton, D.; Chidgey, M. (2006): Desmocollin switching in colorectal cancer. In: *British journal of cancer* 95 (10), S. 1367–1370. DOI: 10.1038/sj.bjc.6603453.

Kimura, Akiko; Baumann, Christian A.; Chiang, Shian-Huey; Saltiel, Alan R. (2001): The sorbin homology domain: A motif for the targeting of proteins to lipid rafts. In: *PNAS* 98 (16), S. 9098–9103.

Kimura, Tomomi E.; Merritt, Anita J.; Garrod, David R. (2007): Calcium-independent desmosomes of keratinocytes are hyper-adhesive. In: *The Journal of investigative dermatology* 127 (4), S. 775–781. DOI: 10.1038/sj.jid.5700643.

Kioka, Noriyuki; Ueda, Kazumitsu; Amachi, Teruo (2002): Vinexin, CAP/ponsin, Ar-gBP2: a Novel Adaptor Protein Family Regulating Cytoskeletal Organization and Signal Transduction. In: *Japan Society for Cell Biology* 27, S. 1–7.

Kljuic, Ana; Hisham Bazzi; Martinez-Mir, Amalia; Sundberg, John P.; O’Shaughnessy, Ryan; Mahoney, My G. et al. (2003): Desmoglein 4 in Hair Follicle Differentiation and Epidermal Adhesion: Evidence from Inherited Hypotrichosis and Acquired Pemphigus Vulgaris 113, S. 249–260.

- Klymkowsky, M. W.; Williams, B. O.; Barish, G. D.; Varmus, H. E.; Vourgourakis, Y. E. (1999): Membrane-anchored plakoglobins have multiple mechanisms of action in Wnt signaling. In: *Molecular biology of the cell* 10 (10), S. 3151–3169. DOI: 10.1091/mbc.10.10.3151.
- Kowalczyk, Andrew P.; Borgwardt, Jeffrey E.; Green, Kathleen J. (1996): Analysis of Desmosomal Cadherin–Adhesive Function and Stoichiometry of Desmosomal Cadherin–Plakoglobin Complexes. In: *Journal of Investigative Dermatology* 107 (3), S. 293–300. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12363000.
- Kowalczyk, Andrew P.; Bornslaeger, Elayne A.; Borgwardt, Jeffrey E.; Palka, Helena L.; Dhaliwal, Avninder S.; Corcoran, Connie M. et al. (1997): The Amino-terminal Domain of Desmoplakin Binds to Plakoglobin and Clusters Desmosomal Cadherin–Plakoglobin Complexes. In: *J Cell Biol* 139 (3), S. 773–784. DOI: 10.1083/jcb.139.3.773.
- Kowalczyk, Andrew P.; Green, Kathleen J. (2013): Structure, function, and regulation of desmosomes. In: *Progress in molecular biology and translational science* 116, S. 95–118. DOI: 10.1016/B978-0-12-394311-8.00005-4.
- Kowalczyk, Andrew P.; Hatzfeld, Mechthild; Bornslaeger, Elayne A.; Kopp, Daniel S.; Borgwardt, Jeffrey E.; Corcoran, Connie M. et al. (1999): The Head Domain of Plakophilin-1 Binds to Desmoplakin and Enhances Its Recruitment to Desmosomes. In: *J. Biol. Chem.* 274 (26), S. 18145–18148. DOI: 10.1074/jbc.274.26.18145.
- Kowalczyk, Andrew P.; Stappenbeck, Thaddeus S.; Parry, David A.D.; Palka, Helena L.; Virata, M.Luisa A.; Bornslaeger, Elayne A. et al. (1994): Structure and function of desmosomal transmembrane core and plaque molecules. In: *Biophysical Chemistry* 50 (1-2), S. 97–112. DOI: 10.1016/0301-4622(94)85023-2.
- Kurrle, Nina; Ockenga, Wymke; Meister, Melanie; Völlner, Frauke; Kühne, Sina; John, Bincy A. et al. (2013a): Phosphatidylinositol 3-Kinase dependent upregulation of the epidermal growth factor receptor upon Flotillin-1 depletion in breast cancer cells. In: *BMC cancer* 13, S. 575. DOI: 10.1186/1471-2407-13-575.
- Kurrle, Nina; Völlner, Frauke; Eming, Rüdiger; Hertl, Michael; Banning, Antje; Tikkanen, Ritva (2013b): Flotillins directly interact with  $\gamma$ -catenin and regulate epithelial cell-cell adhesion. In: *PloS one* 8 (12), e84393. DOI: 10.1371/journal.pone.0084393.

- Lang, Dirk M.; Lommel, Silvia; Jung, Marion; Ankerhold, Richard; Petrausch, Barbara; Laessing, Ute et al. (1998): Identification of Reggie-1 and Reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. In: *J. Neurobiol.* 37 (4), S. 502–523. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4695(199812)37:4<502::AID-NEU2>3.0.CO;2-S.
- Langhorst, M. F.; Reuter, A.; Stuermer, C. A. O. (2005): Scaffolding microdomains and beyond. The function of reggie/flotillin proteins. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62 (19-20), S. 2228–2240. DOI: 10.1007/s00018-005-5166-4.
- Langhorst, Matthias F.; Reuter, Alexander; Jaeger, Friederike A.; Wippich, Frank M.; Luxenhofer, Georg; Plattner, Helmut; Stuermer, Claudia A. O. (2008): Trafficking of the microdomain scaffolding protein reggie-1/flotillin-2. In: *European journal of cell biology* 87 (4), S. 211–226. DOI: 10.1016/j.ejcb.2007.12.001.
- Lewis, Jani E.; \* James K. Wahl III; Sass, Kristin M.; Jensen, Pamela J.; Johnson, Keith R.; Wheelock, Margaret J. (1997): Cross-Talk between Adherens Junctions and Desmosomes Depends on Plakoglobin. In: *The Journal of cell biology* 136 (4).
- Limpert, Allison S.; Karlo, J. Colleen; Landreth, Gary E. (2007): Nerve growth factor stimulates the concentration of TrkA within lipid rafts and extracellular signal-regulated kinase activation through c-Cbl-associated protein. In: *Molecular and Cellular Biology* 27 (16), S. 5686–5698. DOI: 10.1128/MCB.01109-06.
- Liu, Jun; DeYoung, Stephanie M.; Zhang, Mei; Dold, Lisa H.; Saltiel, Alan R. (2005): The SPFH Domain of Flotillin-1 Contains Distinct Sequences That Direct Plasma Membrane Localization And Protein Interactions in 3T3-L1 Adipocytes. In: *Journal of Biological Chemistry* 280.
- Liu, Ya-Wen; Surka, Mark C.; Schroeter, Thomas; Lukiyanchuk, Vasyl; Schmid, Sandra L. (2008): Isoform and Splice-Variant Specific Functions of Dynamin-2 Revealed by Analysis of Conditional Knock-Out Cells. In: *Molecular biology of the cell* 19, S. 5347–5359.
- Löffek, Stefanie; Bruckner-Tuderman, Leena; Magin, Thomas M. (2012): Involvement of the ubiquitin-proteasome system in the stabilization of cell-cell contacts in human keratinocytes. In: *Experimental dermatology* 21 (10), S. 791–793. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2012.01564.x.

- Maeda, Osamu; Usami, Noriyasu; Kondo, Masashi; Takahashi, Masahide; Goto, Hidemi; Shimokata, Kaoru et al. (2004): Plakoglobin (gamma-catenin) has TCF/LEF family-dependent transcriptional activity in beta-catenin-deficient cell line. In: *Oncogene* 23 (4), S. 964–972. DOI: 10.1038/sj.onc.1207254.
- Mannan, T.; Jing, S.; Foroushania, S. H.; Fortune, F.; Wan, H. (2011): RNAi-mediated inhibition of the desmosomal cadherin (desmoglein 3) impairs epithelial cell proliferation. In: *Cell proliferation* 44 (4), S. 301–310. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2011.00765.x.
- Marcozzi, Cristiana; Burdett, Ian D. J.; Buxton, Roger S.; Magee, Anthony I. (1998): Coexpression of both types of desmosomal cadherin and plakoglobin confers strong intercellular adhesion. In: *Journal of cell science* 111, S. 495–509.
- McGrath, John A.; McMillan, James R.; Shemanko, Carrie S.; Runswick, Sarah K.; Leigh, Irene M.; Lane, Birgitte E. et al. (1997): Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. In: *Nature genetics* 17.
- McKoy, Godfrina; Protonotarios, Nikos; Crosby, Andrew; Tsatsopoulou, Adalena; Anastasakis, Aris; Coonar, Aman et al. (2000): Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). In: *The Lancet* 355 (9221), S. 2119–2124. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02379-5.
- Mechanic, S.; Raynor, K.; Hill, J. E.; Cowin, P. (1991): Desmocollins form a distinct subset of the cadherin family of cell adhesion molecules. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (10), S. 4476–4480. DOI: 10.1073/pnas.88.10.4476.
- Meister, M.; Bänfer, S.; Gärtner, U.; Koskimies, J.; Amaddii, M.; Jacob, R.; Tikkanen, R. (2017): Regulation of cargo transfer between ESCRT-0 and ESCRT-I complexes by flotillin-1 during endosomal sorting of ubiquitinated cargo. In: *Oncogenesis* 6 (6), e344. DOI: 10.1038/oncsis.2017.47.
- Meister, Melanie; Tikkanen, Ritva (2014): Endocytic trafficking of membrane-bound cargo. A flotillin point of view. In: *Membranes* 4 (3), S. 356–371. DOI: 10.3390/membranes4030356.
- Meister, Melanie; Tomasovic, Ana; Banning, Antje; Tikkanen, Ritva (2013): Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins. A Recount. In: *International journal of molecular sciences* 14 (3), S. 4854–4884. DOI: 10.3390/ijms14034854.

- Meister, Melanie; Zuk, Alexandra; Tikkanen, Ritva (2014): Role of dynamin and clathrin in the cellular trafficking of flotillins. In: *The FEBS journal* 281 (13), S. 2956–2976. DOI: 10.1111/febs.12834.
- Merriam, J. M.; Rubenstein, A. B.; Klymkowsky, M. W. (1997): Cytoplasmically anchored plakoglobin induces a WNT-like phenotype in *Xenopus*. In: *Developmental biology* 185 (1), S. 67–81. DOI: 10.1006/dbio.1997.8550.
- Merritt, A. J.; Berika, M. Y.; Zhai, W.; Kirk, S. E.; Ji, B.; Hardman, M. J.; Garrod, D. R. (2002): Suprabasal Desmoglein 3 Expression in the Epidermis of Transgenic Mice Results in Hyperproliferation and Abnormal Differentiation. In: *Molecular and Cellular Biology* 22 (16), S. 5846–5858. DOI: 10.1128/MCB.22.16.5846-5858.2002.
- Mertens, C.; Hofmann, I.; Wang, Z.; Teichmann, M.; Sepehri Chong, S.; Schnölzer, M.; Franke, W. W. (2001): Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (14), S. 7795–7800. DOI: 10.1073/pnas.141219498.
- Mertens, Claudia; Kuhn, Caecilia; Moll, Roland; Schwetlick, I.; Franke, W. W. (1999): Desmosomal plakophilin 2 as a differentiation marker in normal and malignant tissues. In: *Differentiation* 64 (5), S. 277. DOI: 10.1007/s002580050281.
- Mertens, Claudia; Kulm, Caecilia; Franke, Werner W. (1996): Plakophilins 2a and 2b. Constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. In: *The Journal of cell biology* 135 (4), S. 1009–1025. DOI: 10.1083/jcb.135.4.1009.
- Miravet, S.; Piedra, J.; Castano, J.; Raurell, I.; Franci, C.; Dunach, M.; Garcia de Herberos, A. (2003): Tyrosine Phosphorylation of Plakoglobin Causes Contrary Effects on Its Association with Desmosomes and Adherens Junction Components and Modulates - Catenin-Mediated Transcription. In: *Molecular and Cellular Biology* 23 (20), S. 7391–7402. DOI: 10.1128/MCB.23.20.7391-7402.2003.
- Miravet, Susana; Piedra, Jose; Miró, Francesc; Itarte, Emilio; García de Herreros, Antonio; Duñach, Mireia (2002): The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (3), S. 1884–1891. DOI: 10.1074/jbc.M110248200.

Morrow, Isabel C.; Rea, Shane; Martin, Sally; Prior, Ian A.; Prohaska, Rainer; Hancock, John F. et al. (2002): Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (50), S. 48834–48841. DOI: 10.1074/jbc.M209082200.

Müller, Eliane J.; Williamson, Lina; Kolly, Carine; Suter, Maja M. (2008): Outside-in signaling through integrins and cadherins. A central mechanism to control epidermal growth and differentiation? In: *The Journal of investigative dermatology* 128 (3), S. 501–516. DOI: 10.1038/sj.jid.5701248.

Neumann-Giesen, Carolin; Falkenbach, Bianca; Beicht, Peter; Claasen, Stephanie; Uers, Georg L.; Stuermer, Claudia A. O. et al. (2004): Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. In: *Biochem. J.* 378, S. 509–518.

Neumann-Giesen, Carolin; Fernow, Inga; Amaddii, Monia; Tikkanen, Ritva (2007): Role of EGF-induced tyrosine phosphorylation of reggie-1/flotillin-2 in cell spreading and signaling to the actin cytoskeleton. In: *Journal of cell science* 120 (Pt 3), S. 395–406. DOI: 10.1242/jcs.03336.

Nicoziani, Paolo; Vilhardt, Frederik; Llorente, Alicia; Hilout, Leila; Courtoy, Pierre J.; Sandvig, Kirsten et al. (2000): Role for Dynamin in Late Endosome Dynamics and Trafficking of the Cation-independent Mannose 6-Phosphate Receptor. In: *MBoC* 11 (2), S. 481–495. DOI: 10.1091/mbc.11.2.481.

Nollet, Friedel; Kools, Patrick; van Roy, Frans (2000): Phylogenetic Analysis of the Cadherin Superfamily allows Identification of Six Major Subfamilies Besides Several Solitary Members. In: *J. Mol. Biol.* 299, S. 551–572.

Norgett, E. Elizabeth; Hatsell Sarah J.; Carvajal-Huerta, Luis; Ruiz Cabezas, Juan-Carlos; Common, John; Purkis, Patricia E. et al. (2000): Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. In: *Human Molecular Genetics* 9 (18), S. 2761–2766. DOI: 10.1093/hmg/9.18.2761.

North, A. J.; Chidgey, M. A.; Clarke, J. P.; Bardsley, W. G.; Garrod, D. R. (1996): Distinct desmocollin isoforms occur in the same desmosomes and show reciprocally graded

distributions in bovine nasal epidermis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (15), S. 7701–7705. DOI: 10.1073/pnas.93.15.7701.

Otto, Grant P.; Nichols, Benjamin J. (2011): The roles of flotillin microdomains--endocytosis and beyond. In: *Journal of cell science* 124 (Pt 23), S. 3933–3940. DOI: 10.1242/jcs.092015.

Palka, Helena L.; Green, Kathleen J. (1997): Roles of plakoglobin end domains in desmosome assembly. In: *Journal of cell science* 110, S. 2359–2371.

Parker, Andrew E.; Wheeler, Grant N.; Arnemann, Joachim; Pidsley, Sara C.; Ataliotis, Paris; Thomas, Claire L. et al. (1991): Desmosomal Glycoproteins II and III. CADHERIN-LIKE JUNCTIONAL MOLECULES GENERATED BY ALTERNATIVE SPLICING. In: *The Journal of biological chemistry* 266, S. 10438–10445.

Payne, Aimee S.; Ishii, Ken; Kacir, Stephen; Lin, Chenyan; Li, Hong; Hanakawa, Yasushi et al. (2005): Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display. In: *J. Clin. Invest.* 115 (4), S. 888–899. DOI: 10.1172/JCI200524185.

Pertz, O.; Bozic, D.; Koch, A. W.; Fauser, C.; Brancaccio, A.; Engel, J. (1999): A new crystal structure, Ca<sup>2+</sup> dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. In: *The EMBO Journal* 18 (7), S. 1738–1747. DOI: 10.1093/emboj/18.7.1738.

Peters, Jan-Michael; Harris, J. Robin; Finley, Daniel (Hg.) (1998): Ubiquitin and the Biology of the Cell. Boston, MA: Springer US.

Pilichou, Kalliopi; Nava, Andrea; Basso, Cristina; Beffagna, Giorgia; Bauce, Barbara; Lorenzon, Alessandra et al. (2006): Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. In: *Circulation* 113 (9), S. 1171–1179. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.583674.

Rajendran, Lawrence; Beckmann, Julia; Magenau, Astrid; Boneberg, Eva-Maria; Gaus, Katharina; Viola, Antonella et al. (2009): Flotillins are involved in the polarization of primitive and mature hematopoietic cells. In: *PloS one* 4 (12), e8290. DOI: 10.1371/journal.pone.0008290.

Rampazzo, Alessandra; Nava, Andrea; Malacrida, Sandro; Beffagna, Giorgia; Bauce, Barbara; Rossi, Valeria et al. (2002): Mutation in human desmoplakin domain binding

- to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. In: *American journal of human genetics* 71 (5), S. 1200–1206. DOI: 10.1086/344208.
- Resnik, Natasa; Sepcic, Kristina; Plemenitas, Ana; Windoffer, Reinhard; Leube, Rudolf; Veranic, Peter (2011): Desmosome assembly and cell-cell adhesion are membrane raft-dependent processes. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (2), S. 1499–1507. DOI: 10.1074/jbc.M110.189464.
- Rickman, Lisa; Šimrak, Danijela; Stevens, Howard P.; Hunt, Debbie M.; King, Ian A.; Bryant, Stephen P. et al. (1999): N-terminal deletion in a desmosomal cadherin causes the autosomal dominant skin disease striate palmoplantar keratoderma. In: *Human Molecular Genetics* 8 (6), S. 971–976. DOI: 10.1093/hmg/8.6.971.
- Riento, Kirsi; Frick, Manfred; Schafer, Ingmar; Nichols, Benjamin J. (2009): Endocytosis of flotillin-1 and flotillin-2 is regulated by Fyn kinase. In: *Journal of cell science* 122 (Pt 7), S. 912–918. DOI: 10.1242/jcs.039024.
- Roitbak, Tamara; Surviladze, Zurab; Tikkanen, Ritva; Wandinger-Ness, Angela (2005): A polycystin multiprotein complex constitutes a cholesterol-containing signalling microdomain in human kidney epithelia. In: *The Biochemical journal* 392 (Pt 1), S. 29–38. DOI: 10.1042/BJ20050645.
- Rossy, Jérémie; Schlicht, Dominique; Engelhardt, Britta; Niggli, Verena (2009): Flotillins interact with PSGL-1 in neutrophils and, upon stimulation, rapidly organize into membrane domains subsequently accumulating in the uropod. In: *PloS one* 4 (4), e5403. DOI: 10.1371/journal.pone.0005403.
- Rötzer, Vera; Hartlieb, Eva; Vielmuth, Franziska; Gliem, Martin; Spindler, Volker; Waschke, Jens (2015): E-cadherin and Src associate with extradesmosomal Dsg3 and modulate desmosome assembly and adhesion. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72 (24), S. 4885–4897. DOI: 10.1007/s00018-015-1977-0.
- Ruiz, Patricia; Brinkmann, Volker; Ledermann, Birgit; Behrend, Martin; Grund, Christine; Thalhammer, Christoph et al. (1996): Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. In: *The Journal of cell biology* 135 (1), S. 215–225. DOI: 10.1083/jcb.135.1.215.

- Sadot, Einat; Simcha, Inbal; Iwai, Kazuhiro; Ciechanover, Aaron; Geiger, Benjamin; Ben-Ze'ev, Avri (2000): Differential interaction of plakoglobin and  $\beta$ -catenin with the ubiquitin-proteasome system. In: *Oncogene* 19.
- Saito, M.; Tucker, D. K.; Kohlhorst, D.; Niessen, C. M.; Kowalczyk, A. P. (2012): Classical and desmosomal cadherins at a glance. In: *Journal of cell science* 125 (11), S. 2547–2552. DOI: 10.1242/jcs.066654.
- Sakuntabhai, Anavaj; Ruiz-Perez, Victor; Carter, Simon; Jacobsen, Nick; Burge, Susan; Monk, Sarah et al. (1999): Mutations in ATP2A2, encoding a Ca<sup>2+</sup> pump, cause Darier disease. In: *Nature genetics* 21, S. 271–277.
- Salomon, Daniela; Sacco, Paula A.; Roy, Sujata Guha; Simcha, Inbal; Johnson, Keith R.; Wheelock, Margaret J.; Ben-Ze'ev, Avri (1997): Regulation of  $\beta$ -Catenin Levels and Localization by Overexpression of Plakoglobin and Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System. In: *J Cell Biol* 139 (5), S. 1325–1335. DOI: 10.1083/jcb.139.5.1325.
- Samuelov, Liat; Sarig, Ofer; Harmon, Robert M.; Rapaport, Debora; Ishida-Yamamoto, Akemi; Isakov, Ofer et al. (2013): Desmoglein 1 deficiency results in severe dermatitis, multiple allergies and metabolic wasting. In: *Nature genetics* 45 (10), S. 1244–1248. DOI: 10.1038/ng.2739.
- Sánchez-Madrid, Francisco; Serrador, Juan M. (2009): Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. In: *Molecular cell Biology* 10, S. 353–359.
- Sandvig, Kirsten; Pust, Sascha; Skotland, Tore; van Deurs, Bo (2011): Clathrin-independent endocytosis. Mechanisms and function. In: *Current Opinion in Cell Biology* 23 (4), S. 413–420. DOI: 10.1016/j.ceb.2011.03.007.
- Santamaría, Anna; Castellanos, Elisabeth; Gómez, Valentí; Bedit, Patricia; Renau-Piqueras, Jaime; Morote, Juan et al. (2005): PTOV1 enables the nuclear translocation and mitogenic activity of flotillin-1, a major protein of lipid rafts. In: *Molecular and Cellular Biology* 25 (5), S. 1900–1911. DOI: 10.1128/MCB.25.5.1900-1911.2005.
- Sato, Miki; Aoyama, Yumi; Kitajima, Yasuo (2000): Assembly Pathway of Desmoglein 3 to Desmosomes and Its Perturbation by Pemphigus Vulgaris-IgG in Cultured Keratinocytes, as Revealed by Time-Lapsed Labeling Immunoelectron Microscopy. In: *Lab Invest* 80 (10), S. 1583–1592. DOI: 10.1038/labinvest.3780168.

Schäfer, Stephan; Stumpp, Sabine; Franke, W. W. (1996): Immunological identification and characterization of the desmosomal cadherin Dsg2 in coupled and uncoupled epithelial cells and in human tissues. In: *Differentiation* 60 (2), S. 99. DOI: 10.1007/s002580050140.

Schlegel, Nicolas; Meir, Michael; Heupel, Wolfgang-Moritz; Holthöfer, Bastian; Leube, Rudolf E.; Waschke, Jens (2010): Desmoglein 2-mediated adhesion is required for intestinal epithelial barrier integrity. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 298 (5), G774-83. DOI: 10.1152/ajpgi.00239.2009.

Schmidt, Ansgar; Langbein, Lutz; Prätzel, Silke; Rode, Michaela; Rackwitz, Hans-Richard; Franke, W. W. (1999): Plakophilin 3 — a novel cell-type-specific desmosomal plaque protein. In: *Differentiation* 64 (5), S. 291–306. DOI: 10.1007/s002580050282.

Schmidt, Ansgar; Langbein, Lutz; Rode, Michaela; Prätzel, Silke; Zimbelmann, Ralf; Franke, Werner W. (1997): Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. In: *Cell Tissue Res* 290, 481-499.

Schneider, Anja; Rajendran, Lawrence; Honsho, Masanori; Gralle, Matthias; Donnert, Gerald; Wouters, Fred et al. (2008): Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (11), S. 2874–2882. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5345-07.2008.

Schroeder, Wanda T.; Siciliano, Michael J.; Stewart-Galetka, Shelley L.; Duvic, Madeleine (1991): The human gene for an epidermal surface antigen (M17S1) is located at 17q11–12. In: *Genomics* 11 (2), S. 481–482. DOI: 10.1016/0888-7543(91)90166-C.

Schulte, Thomas; Paschke, Katja A.; Laessing, Ute; Lottspeich, Friedrich; Stuermer, Claudia A. O. (1997): Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. In: *Development* 124, S. 577–587.

Sharma, Preety; Mao, Xuming; Payne, Aimee S. (2007): Beyond steric hindrance. The role of adhesion signaling pathways in the pathogenesis of pemphigus. In: *Journal of dermatological science* 48 (1), S. 1–14. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2007.05.005.

- Simpson, Cory L.; Patel, Dipal M.; Green, Kathleen J. (2011): Deconstructing the skin. Cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 12 (9), S. 565–580. DOI: 10.1038/nrm3175.
- Smith, Elizabeth A.; Fuchs, Elaine (1998): Defining the Interactions Between Intermediate Filaments and Desmosomes. In: *J Cell Biol* 141 (5), S. 1229–1241. DOI: 10.1083/jcb.141.5.1229.
- Solis, Gonzalo P.; Hoegg, Maja; Munderloh, Christina; Schrock, Yvonne; Malaga-Trillo, Edward; Rivera-Milla, Eric; Stuermer, Claudia A. O. (2007): Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains. In: *The Biochemical journal* 403 (2), S. 313–322. DOI: 10.1042/BJ20061686.
- Solis, Gonzalo P.; Schrock, Yvonne; Hülsbusch, Nikola; Wiechers, Marianne; Plattner, Helmut; Stuermer, Claudia A. O. (2012): Reggies/flotillins regulate E-cadherin-mediated cell contact formation by affecting EGFR trafficking. In: *Molecular biology of the cell* 23 (10), S. 1812–1825. DOI: 10.1091/mbc.E11-12-1006.
- South, Andrew P.; Wan, Hong; Stone, Michael G.; Dopping-Hepenstal, Patricia J. C.; Purkis, Patricia E.; Marshall, John F. et al. (2003): Lack of plakophilin 1 increases keratinocyte migration and reduces desmosome stability. In: *Journal of cell science* 116 (Pt 16), S. 3303–3314. DOI: 10.1242/jcs.00636.
- Stahley, Sara N.; Saito, Masataka; Faundez, Victor; Koval, Michael; Mattheyses, Alexa L.; Kowalczyk, Andrew P. (2014): Desmosome assembly and disassembly are membrane raft-dependent. In: *PloS one* 9 (1), e87809. DOI: 10.1371/journal.pone.0087809.
- Stanley, John R.; Amagai, Masayuki (2006a): Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. In: *The New England journal of medicine* 355 (17), S. 1800–1810. DOI: 10.1056/NEJMra061111.
- Stanley, John R.; Amagai, Masayuki (2006b): Pemphigus, bullous impetigo, and the staphylococcal scalded-skin syndrome. In: *The New England journal of medicine* 355 (17), S. 1800–1810. DOI: 10.1056/NEJMra061111.
- Stappenbeck, Thaddeus S.; Kathleen J. Green (1992): The Desmoplakin Carboxyl Terminus Coaligns with and Specifically Disrupts Intermediate Filament Networks When Expressed in Cultured Cells. In: *The Journal of cell biology* 116 (5), S. 1197–1209.

Stuermer, C. A.O.; Lang, D. M.; Kirsch, F.; Wiechers, M.; Deininger, S.-O.; Plattner, H. (2001): Glycosylphosphatidyl Inositol-anchored Proteins and fyn Kinase Assemble in Noncaveolar Plasma Membrane Microdomains Defined by Reggie-1 and -2. In: *Molecular biology of the cell* 12 (10), S. 3031–3045. DOI: 10.1091/mbc.12.10.3031.

Syed, Shabih-e-Hassnain; Trinnman, Brian; MARTIN, Stephen; MAJOR, Sarah; HUTCHINSON, Jon; I. MAGEE, Anthony (2002): Molecular interactions between desmosomal cadherins. In: *Biochem. J.* 362 (2), S. 317. DOI: 10.1042/0264-6021:3620317.

Syrris, Petros; Ward, Deirdre; Asimaki, Angeliki; Sen-Chowdhry, Srijita; Ebrahim, Hatim Y.; Evans, Alison et al. (2006): Clinical expression of plakophilin-2 mutations in familial arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. In: *Circulation* 113 (3), S. 356–364. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.561654.

Takeichi, Masatoshi (1990): Cadherins: A Molecular Family Important in Selective Cell-Cell Adhesion 59, S. 237–252.

Thomason, Helen A.; Cooper, Nichola H.; Ansell, David M.; Chiu, Maybo; Merrit, Anita J.; Hardman, Matthew J.; Garrod, David R. (2012): Direct evidence that PKC $\alpha$  positively regulates wound re-epithelialization. Correlation with changes in desmosomal adhesiveness. In: *The Journal of pathology* 227 (3), S. 346–356. DOI: 10.1002/path.4016.

Thomason, Helen A.; Scothern, Anthea; McHarg, Selina; Garrod, David R. (2010): Desmosomes. Adhesive strength and signalling in health and disease. In: *Biochem. J.* 429 (3), S. 419–433. DOI: 10.1042/BJ20100567.

Tomasovic, Ana; Traub, Stephanie; Tikkanen, Ritva (2012): Molecular networks in FGF signaling. Flotillin-1 and cbl-associated protein compete for the binding to fibroblast growth factor receptor substrate 2. In: *PloS one* 7 (1), e29739. DOI: 10.1371/journal.pone.0029739.

Troyanovsky, Sergey M.; TROYANOVSKY\*, Regina B.; Eshkind, Leonid G.; Leube, Rudolf E.; Franke, Werner W. (1994): Identification of amino acid sequence motifs in desmocollin, a desmosomal glycoprotein, that are required for plakoglobin binding and plaque formation. In: *Biochemistry* 91, 10790-10794.

Tselepis, C.; Chidgey, M.; North, A.; Garrod, D. (1998): Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (14), S. 8064–8069. DOI: 10.1073/pnas.95.14.8064.

Ungewiß, Hanna; Vielmuth, Franziska; Suzuki, Shintaro T.; Maiser, Andreas; Harz, Hartmann; Leonhardt, Heinrich et al. (2017): Desmoglein 2 regulates the intestinal epithelial barrier via p38 mitogen-activated protein kinase. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 6329. DOI: 10.1038/s41598-017-06713-y.

van Dam, Ellen M.; Broeke, Toine ten; Jansen, Karen; Spijkers, Patricia; Stoorvogel, Willem (2002): Endocytosed transferrin receptors recycle via distinct dynamin and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (50), S. 48876–48883. DOI: 10.1074/jbc.M206271200.

Villaret, D. B.; Wang, T.; Dillon, D.; Xu, J.; Sivam, D.; Cheever, M. A.; Reed, S. G. (2000): Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. In: *The Laryngoscope* 110 (3 Pt 1), S. 374–381. DOI: 10.1097/00005537-200003000-00008.

Völlner, Frauke (2016): Flotillins as novel regulators of desmosome dynamics. Manuskript unv. Diss. Frankfurt am Main.

Völlner, Frauke; Ali, Jawahir; Kurrle, Nina; Exner, Yvonne; Eming, Rüdiger; Hertl, Michael et al. (2016): Loss of flotillin expression results in weakened desmosomal adhesion and Pemphigus vulgaris-like localisation of desmoglein-3 in human keratinocytes. In: *Scientific reports* 6, S. 28820. DOI: 10.1038/srep28820.

Volonté, Daniela; Galbiati, Ferruccio; Li, Shengwen; Nishiyama, Kazutoshi; Okamoto, Takashi; Lisanti, Michael P. (1999): Flotillins/Cavatellins Are Differentially Expressed in Cells and Tissues and Form a Hetero-oligomeric Complex with Caveolins in Vivo. In: *J. Biol. Chem.* 274 (18), S. 12702–12709. DOI: 10.1074/jbc.274.18.12702.

Walter, Elias; Vielmuth, Franziska; Rotkopf, Lukas; Sárdy, Miklós; Horváth, Orsolya N.; Goebeler, Matthias et al. (2017): Different signaling patterns contribute to loss of keratinocyte cohesion dependent on autoantibody profile in pemphigus. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 3579. DOI: 10.1038/s41598-017-03697-7.

- Walter, Elias; Vielmuth, Franziska; Wanuske, Marie-Therès; Seifert, Matthias; Pollmann, Robert; Eming, Rüdiger; Waschke, Jens (2019): Role of Dsg1- and Dsg3-Mediated Signaling in Pemphigus Autoantibody-Induced Loss of Keratinocyte Cohesion. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 1128. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01128.
- Wang, Hongjie; Li, Zong-Yi; Liu, Ying; Persson, Jonas; Beyer, Ines; Möller, Thomas et al. (2011): Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. In: *Nature medicine* 17 (1), S. 96–104. DOI: 10.1038/nm.2270.
- Waschke, Jens (2008): The desmosome and pemphigus. In: *Histochemistry and cell biology* 130 (1), S. 21–54. DOI: 10.1007/s00418-008-0420-0.
- Whittock, Neil V.; Bower, Christopher (2003): Genetic evidence for a novel human desmosomal cadherin, desmoglein 4. In: *The Journal of investigative dermatology* 120 (4), S. 523–530. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2003.12113.x.
- Williamson, Lina; Raess, Natalia A.; Caldelari, Reto; Zakher, Anthony; Bruin, Alain de; Posthaus, Horst et al. (2006): Pemphigus vulgaris identifies plakoglobin as key suppressor of c-Myc in the skin. In: *The EMBO Journal* 25 (14), S. 3298–3309. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601224.
- Windoffer, Reinhard; Borchert-Stuhlträger, Monika; Leube, Rudolf E. (2002): Desmosomes: interconnected calcium-dependent structures of remarkable stability with significant integral membrane protein turnover. In: *Journal of cell science* 115, 1717-1732.
- Yashiro, Masakazu; Nishioka, Nobuaki; Hirakawa, Kosei (2006): Decreased expression of the adhesion molecule desmoglein-2 is associated with diffuse-type gastric carcinoma. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 42 (14), S. 2397–2403. DOI: 10.1016/j.ejca.2006.03.024.
- Zhurinsky, Jacob; Shtutman, Michael; Ben-Ze'ev, Avri (2000): Plakoglobin and  $\beta$ -catenin: protein interactions, regulation and biological roles. In: *Journal of cell science* 113, S. 3127–3139.

## VII. Publikationen

Völlner, Frauke; Ali, Jawahir; Kurrle, Nina; Exner, Yvonne; Eming, Rüdiger; Hertl, Michael et al. (2016): Loss of flotillin expression results in weakened desmosomal adhesion and Pemphigus vulgaris-like localisation of desmoglein-3 in human keratinocytes. In: *Scientific reports* 6, S. 28820. DOI: 10.1038/srep28820.

## VIII. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-LiebigUniversität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Kassel, 28.12.2020

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## IX. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Professorin Dr. Ritva Tikkanen für ihre hervorragende Betreuung und enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Einen wichtigen Beitrag leisteten zudem die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Tikkanen: Antje Banning, Ralf Füllkrug, Petra Janson sowie Frauke Voellner, da ihre Türen für mich und meine Fragen stets offenstanden und sie mich mit zielführenden Hilfestellungen begleiteten.

Des Weiteren danke ich der Hans-Böckler-Stiftung für die finanzielle Unterstützung, mithilfe der ich während meines Medizinstudiums die experimentellen Arbeiten durchführen konnte, was die Basis dieser Arbeit darstellt.

Meiner Familie möchte ich für den starken privaten Rückhalt danken. Dank gebührt zunächst meinem Vater, der mir zu seinen Lebzeiten Mut, Stärke und Demut vorlebte. Zudem meiner liebevollen Mutter, die es zu ihrer Lebensaufgabe machte, uns gelingend ins Leben zu begleiten. Weiterhin meinen wundervollen Geschwistern Kadija, Fathiya, Said, Abdi, Amal, Safiya und Yasmin, die mir stets zur Seite standen und immer an mich glaubten. Meine Dankbarkeit gilt auch Luba und Nikolai Lening für ihre liebevolle Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich bei dem Menschen bedanken, der mich tagtäglich im Verlauf des gesamten Prozesses durch meine Höhen und auch gelegentlichen Tiefen begleitet hat, beginnend mit der Zusage von Professorin Dr. Tikkanen bis hin zur Drucklegung dieser Arbeit: Danke an meinen Ehemann Dennis Lening – für seinen Zuspruch zu und Ermutigungen während dieser Dissertation.